



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Università degli Studi di Roma Sapienza

Dipartimento di Neurologia e Psichiatria - Neurochirurgia

Dottorato di Ricerca – XXVIII Ciclo

Malattie dello Scheletro e del Distretto Oro-Cranio-Facciale



TESI DI DOTTORATO

**ANALISI DELLE PROPRIETÀ BIOMECCANICHE DEI
TUMORI CEREBRALI**

**IMPRONTA NANOMECCANICA DI GLIOMI, MENINGIOMI E TESSUTO
CEREBRALE SANO IN MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA**

Tutor

Prof. Roberto Delfini

Dottoranda

Tanya Enny Sassun

Anno accademico 2014-2015

A Guido con amore

INDICE

INTRODUZIONE	5
1. GLIOMI CEREBRALI	9
1.1 Caratteristiche patologiche	9
1.1.1 Anomalie genetiche e biologia molecolare nei gliomi	12
1.2 Indicazioni chirurgiche	13
1.3 Glioblastoma multiforme e limiti dell'asportazione chirurgica	13
1.4 Matrice extracellulare nel parenchima cerebrale sano	15
1.5 Matrice extracellulare nel glioma	17
1.5.1 Matrice extracellulare e rigidità meccanica nel glioma	17
1.5.2 Mimetismo vasculogenico nel glioma	18
1.5.3 Molecole della matrice extracellulare nel glioma	20
1.5.3.1 Acido ialuronico e molecola di adesione CD44	20
1.5.3.2 Condroitin solfato proteoglicani	20
1.5.3.3 Molecole ECM associate alla vascolarizzazione espresse dal glioma	21
1.5.4 Metalloproteasi della matrice e loro inibitori nel glioma	24
1.5.4.1 Metalloproteasi nel glioma	24
1.5.4.2 Inibitori tissutali delle metalloproteasi della matrice nel glioma	26
2. MENINGIOMI CEREBRALI	27
2.1 Caratteristiche patologiche	27
2.1.1 Anomalie genetiche e biologia molecolare nei meningiomi	29
2.1.1.1 Progressione maligna nel meningioma	30
2.2 Considerazioni chirurgiche	30
2.3 Matrice extracellulare nel meningioma	31
3. BIOMECCANICA E MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA	33
3.1 Meccanica della cellula e modulo elastico di Young	33
3.2 Modelli meccanici della cellula	35
3.3 Proprietà meccaniche dei tessuti	36
3.3.1 Il ruolo della matrice extracellulare	37
3.3.2 Trasduzione dei segnali meccanici	38
3.4 Meccanica dei tessuti e tumorigenesi	39
3.5 Microscopia a forza atomica e spettroscopia di forza	39
3.5.1 Stiffness del campione biologico: analisi Herziana delle curve forza-distanza	42
3.5.2 Forze viscoelastiche - Isteresi e adesione	43

4. MATERIALI E METODI	46
4.1 Approvazione del Comitato Etico	46
4.2 Popolazione di pazienti	46
4.3 Prelievo chirurgico e preparazione dei campioni	46
4.4 Allestimento dei campioni per le misure AFM	47
4.5 Preparati istologici	47
4.6 Misure AFM	48
5. RISULTATI	52
5.1 Diagnosi istologica	52
5.2 Risultati chirurgici e clinici	52
5.3 Analisi AFM e correlati anatomo-patologici	56
5.3.1 Caratterizzazione nanomeccanica di tessuti di glioblastoma	56
5.3.2 Alla ricerca del margine tumorale: caratterizzazione nanomeccanica della sostanza bianca	60
5.3.3 Caratterizzazione nanomeccanica dell'ascesso cerebrale	61
5.3.4 Ruolo delle forze viscoelastiche nel comportamento biomeccanico del glioblastoma	62
5.3.5 Caratterizzazione nanomeccanica di tessuti di meningioma	65
5.3.5.1 Risposta biomeccanica dei vortici	68
5.3.5.2 Risposta biomeccanica dei corpi psammomatosi	69
5.3.6 Ruolo delle forze viscoelastiche nel comportamento biomeccanico del meningioma	71
5.3.7 Caratterizzazione biomeccanica di meningiomi di grado II WHO	74
5.3.8 Caratterizzazione delle proprietà di adesione dei tumori cerebrali	76
6. DISCUSSIONE	78
6.1 L'impronta nonomeccanica dei tumori cerebrali	81
6.2 Glioblastoma e meningioma, sviluppo e diffusione: microambienti extracellulari a confronto	83
6.3 <i>Fingerprint</i> della necrosi nel glioblastoma	85
6.4 <i>Fingerprint</i> della neo-angiogenesi nel glioblastoma	86
6.5 <i>Fingerprint</i> della dura madre infiltrata	86
6.6 <i>Fingerprint</i> dei meningiomi di grado II	87
6.7 Considerazioni e prospettive future	89
RINGRAZIAMENTI	91
BIBLIOGRAFIA	92

INTRODUZIONE

Storicamente, non solo in ambito neuro-oncologico, la ricerca sul cancro si è focalizzata principalmente sul ruolo dei cambiamenti biochimici e genetici nella progressione tumorale. Nel corso dell'ultimo decennio, sta emergendo ampia evidenza che il microambiente biomeccanico del tumore, con i suoi stimoli fisici, possa influenzare le cellule tanto profondamente quanto i segnali biochimici e genetici.¹ In condizioni fisiologiche, le cellule sono soggette a un ampio spettro di forze fisiche e meccaniche, le quali giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo e nel mantenimento del tessuto. Questi segnali meccanici influenzano profondamente le reazioni biochimiche nelle cellule, modulando numerosi processi cellulari, come la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi, ciascuno dei quali è cruciale per il mantenimento della normale omeostasi. Il modo in cui le cellule percepiscono queste forze, e quindi rispondono a esse, è in larga parte mediato dalla matrice extracellulare, che rappresenta la principale componente del microambiente in cui esse sono immerse.²⁻⁵ In molte condizioni patologiche, come in presenza di neoplasie, si verifica uno stravolgimento dell'omeostasi meccanica che regola la complessa interazione fra le cellule e la loro matrice extracellulare.⁵ L'insorgenza e la progressione del tumore, infatti, sono accompagnate da importanti modificazioni nelle proprietà meccaniche sia delle cellule sia della matrice extracellulare che le circonda, modificazioni che avvengono a tutti i livelli: molecolare, cellulare e tissutale.^{5,6}

I recenti progressi tecnologici in ambito biofisico, come l'utilizzo del microscopio a forza atomica, hanno consentito di sondare direttamente le proprietà meccaniche di cellule e tessuti e di fornire stime quantitative delle modificazioni che avvengono nel corso dell'oncogenesi e della progressione tumorale.

La Microscopia a Forza Atomica (AFM) possiede funzionalità uniche per sondare le proprietà biomeccaniche di cellule viventi e tessuti, e permette di mappare la distribuzione spaziale delle proprietà meccaniche delle cellule, fornendo indicazioni indirette sulla struttura e sulla funzione del sottostante citoscheletro e degli organuli cellulari.⁷

Misure di indentazione AFM hanno dimostrato come le cellule cancerose in vitro siano più morbide rispetto alla controparte sana. Questa variazione della deformabilità è stata associata a importanti alterazioni dell'architettura citoscheletrica che, a loro volta, sono associate con la trasformazione maligna.⁸⁻¹¹

Misure AFM hanno dunque rafforzato la nostra comprensione della meccanica delle cellule in condizioni normali e patologiche, fornendo dati di enorme rilevanza per lo studio della fisiopatologia della malattia tumorale e aprendo la strada a nuove opzioni diagnostiche e terapeutiche.^{7,12} La fenotipizzazione meccanica delle cellule mediante microscopia a forza atomica è stata recentemente proposta come nuovo strumento di ricerca in ambito oncologico umano.¹³

Il primo lavoro di analisi AFM eseguito su cellule neoplastiche umane vive riportato in letteratura è quello di Cross S.E. et al. del 2007,¹⁴ in cui sono state utilizzate cellule di carcinoma metastatico prelevate da fluidi corporei (pleurici) di pazienti con sospetto interessamento neoplastico di polmone, mammella e pancreas. Ulteriori studi hanno in seguito contribuito a caratterizzare le proprietà meccaniche di cellule neoplastiche umane, provenienti da diversi tipi di tumori (e.g., mammario,¹⁵ ovarico,¹⁶ colon¹⁷, rene¹⁸), dimostrando in particolare come le cellule cancerose siano più "soffici" rispetto alle cellule sane.¹⁴⁻²⁰

Tuttavia gli studi condotti fino ad oggi sulle risposte biomeccaniche di singole cellule analizzate al di fuori del loro microambiente naturale non tengono in considerazione l'influenza dei rapporti intercellulari e di quelli che intercorrono fra cellule e matrice extracellulare circostante. Le misure di *stiffness* (rigidità) tramite AFM registrate su tessuti biologici hanno consentito di distinguere cellule cancerose da cellule non maligne e da cellule cancerose meno differenziate in base alla risposta elastica.²¹

Il primo lavoro riportato in letteratura in cui è stata eseguita una caratterizzazione nanomeccanica tramite AFM di tessuti mammari umani e non di singole cellule è quello apparso su *Nature Nanotechnology* del 2012 di Plodinec M., et al.²² Gli autori, analizzando biopsie di carcinoma mammario umano e valutandone le caratteristiche di *stiffness* hanno identificato caratteristiche meccaniche uniche che permettono di distinguere i diversi stadi della progressione neoplastica. Lo studio fornisce non soltanto nuovi possibili marker biomeccanici per valutare l'insorgenza del cancro, ma anche nuovi indici prognostici, sia pur limitatamente al carcinoma mammario.

In contrasto con la morbidezza delle cellule, i tessuti tumorali sembrano essere significativamente più rigidi rispetto a quelli sani.²³ Questa aumentata rigidità è una caratteristica distintiva fondamentale della patologia neoplastica e dà conto di come la palpazione rimanga ancora uno strumento chiave nella scoperta di molti tumori.²³ Tale alterazione è principalmente una diretta conseguenza di un'aumentata deposizione di proteine della matrice extracellulare come collagene, fibronectina e laminina.^{22,24}

Nel corso degli ultimi tre anni, misure biomeccaniche AFM sono state effettuate su alcune tipologie di tessuti neoplastici umani, alla ricerca di comportamenti biomeccanici analoghi o distinti da quelli trovati per il carcinoma mammario nel pionieristico lavoro di Plodinec et al.^{22,25-27}

Il glioblastoma multiforme rappresenta il più comune tumore cerebrale maligno dell'adulto e il meningioma il più comune tumore cerebrale benigno.²⁸ Questi tumori rappresentano pertanto una fra le principali cause neuro-oncologiche che portano il paziente all'osservazione neurochirurgica cui consegue, solitamente, l'intervento di asportazione chirurgica della lesione. Per questo motivo abbiamo analizzato glioblastomi e meningiomi di pazienti giunti alla nostra osservazione nell'intento di identificare e validare nuovi marker biomeccanici in grado di discriminare neoplasie cerebrali maligne, benigne, e tessuto sano e, ove possibile, individuare l'interfaccia tumore/tessuto sano.

Il glioblastoma multiforme è un tumore cerebrale altamente invasivo, che non metastatizza al di fuori del sistema nervoso centrale. Il carattere fortemente aggressivo di questo tumore è legato alla sua modalità unica di infiltrazione, intimamente connessa alla peculiare struttura della matrice extracellulare cerebrale.²⁹ Nel cervello normale i livelli di proteine fibrose sono estremamente bassi in confronto con quelli osservati in tessuti connettivi al di fuori del sistema nervoso centrale. D'altro canto, l'ambiente extracellulare del cervello normale presenta alti livelli di molecole "di riempimento spaziale" quali il grande glicosaminoglicano acido ialuronico. Come conseguenza di questa peculiare struttura, il tessuto cerebrale è molto più morbido rispetto agli altri tessuti, con un modulo elastico di Young medio intorno a 1 kPa.^{30,31} L'acido ialuronico crea un microambiente che facilita la migrazione, la proliferazione, la sopravvivenza e l'invasione delle cellule di glioblastoma.³²⁻³⁴ Le cellule di glioma producono costitutivamente acido ialuronico e la sua produzione è incrementata durante la proliferazione cellulare,³⁵ promuovendo l'invasione del glioma.³⁶

Tuttavia, il parenchima cerebrale normale non è omogeneo e presenta strutture con rigidità meccanica maggiore, come la membrana basale dei vasi sanguigni e i tratti di fibre mieliniche della materia bianca. A causa della loro rigidità meccanica, tali strutture vengono utilizzate come percorso infiltrativo per l'invasione del glioma.^{37,38} A questo proposito le cellule tumorali favoriscono la crescita di vasi neoformati, stimolando la secrezione di fattori di crescita pro-angiogenici; la neo-angiogenesi tipica dei glioblastomi, con proliferazione di nuovi vasi e capillari dalle pareti sottili, facilita la migrazione e la diffusione delle cellule neoplastiche.³⁹ Il fatto che alcune strutture siano vie preferenziali per la propagazione tumorale in virtù delle loro caratteristiche meccaniche conferma come la *stiffness* del microambiente tumorale sia uno dei parametri chiave che regola la diffusione delle cellule neoplastiche.^{37,38}

Ciò è stato ulteriormente confermato dagli esperimenti di Ulrich e collaboratori, in cui cellule di glioma sono state messe in coltura su una matrice extracellulare simile a quella cerebrale,

con *stiffness* variabile da quella del cervello normale a quella di tessuto cerebrale tumorale. È interessante notare come le cellule in coltura su substrati morbidi, con rigidità comparabile a quella del cervello normale, mostrino una motilità ridotta e una capacità di diffusione estremamente limitata. Al contrario, un incremento nella rigidità della matrice extracellulare provoca un aumento della proliferazione, della motilità e della diffusione delle cellule.³⁷ Osservazioni simili sono state riportate da Thomas e DiMilla, i quali hanno mostrato come un aumento/diminuzione della rigidità della matrice extracellulare comporti un aumento/diminuzione della motilità cellulare.⁴⁰ Tali dati suggeriscono che le cellule del glioma abbiano la capacità di rimodellare attivamente il proprio microambiente, modificando la matrice extracellulare da cerebrale normale a rigida di tipo tumorale.⁴¹ Uno degli stadi di tale processo include la degradazione proteolitica della matrice extracellulare del parenchima cerebrale sano e la secrezione di una matrice più dura con un'aumentata espressione di collagene e fibronectina.³⁷

Laddove studi sul potenziale invasivo dei gliomi in relazione alle alterazioni della matrice extracellulare sono ben documentati,^{42,43} non altrettanto si può dire per i meningiomi, per i quali sono riportati in letteratura limitati lavori al riguardo.⁴⁴

La principale funzione di derivazione mesenchimale delle cellule di meningioma è la loro capacità di elaborare proteine della matrice extracellulare.⁴⁵ Inoltre, in questi tumori, è stata dimostrata la presenza di elevati livelli di proteasi in grado di degradare la matrice extracellulare.⁴⁶ Questi aspetti sarebbero i principali responsabili del rimodellamento del microambiente extracellulare che favorisce lo sviluppo del meningioma.

I meningiomi sono tumori benigni e, a differenza dei gliomi, non si accrescono infiltrando e invadendo il parenchima cerebrale contiguo ma piuttosto crescono per espansione, portando alla compressione delle strutture cerebrali adiacenti, senza invaderle e mantenendosi come una massa distinta e ben distinguibile dal parenchima sano circostante, dal quale solitamente risultano divisi da un sottile strato aracnoideo. Per questo motivo solitamente è ben identificabile un piano di clivaggio tumore-parenchima cerebrale sano in sede di asportazione chirurgica. Tuttavia alcuni meningiomi possono manifestare comportamenti più aggressivi (gradi II e III WHO) con tendenza alla recidiva neoplastica dopo asportazione chirurgica e con aspetti di infiltrazione neoplastica, sebbene solitamente il percorso infiltrativo di questi tumori non sia paragonabile a quello dei gliomi e si porti ad interessare la dura madre e l'osso.⁴⁷⁻⁴⁹ È stato dimostrato che la degradazione proteolitica della matrice extracellulare risulta maggiore nelle recidive di meningioma,⁴⁶ inoltre risulta alterata anche la regolazione dall'attività proteolitica con livelli significativamente inferiori degli inibitori delle proteasi nei meningiomi di alto grado rispetto ai meningiomi non invasivi.⁵⁰

Le molteplici evidenze riportate confermano il ruolo fondamentale che i segnali meccanici del microambiente tumore-matrice extracellulare giocano nello sviluppo, nella diffusione e nella progressione di gliomi e di meningiomi cerebrali.

Ad oggi non risulta alcuno studio in letteratura che esamini le proprietà biomeccaniche dei tessuti cerebrali tramite AFM in campioni biologici umani, né che proponga un'analisi differenziale delle proprietà biomeccaniche mettendo a confronto neoplasia cerebrale maligna, neoplasia benigna e tessuto cerebrale sano.

Questo lavoro riporta uno studio approfondito sulle proprietà nanomeccaniche di campioni tissutali di glioblastomi e di meningiomi prelevati in sede di asportazione chirurgica, analizzati tramite misure di indentazione AFM (IT-AFM) e sottoposti ad indagini anatomico-patologiche di tipo istologico (ematossilina-eosina, Gomori per le proteine fibrose) ed istochimico (alcian blu per l'acido ialuronico) per conferma diagnostica e di caratterizzazione delle molecole della matrice extracellulare.

Lo studio mostra come tali proprietà biomeccaniche correlino con specifici marker istopatologici, con l'obiettivo di identificare "un'impronta meccanica" specifica per il glioblastoma e una specifica per il meningioma. Inoltre l'identificazione di profili di comportamento biomeccanico differenti può essere utilizzata nella determinazione dello

stadio del tumore, con importante valenza prognostica sul piano clinico. Da un punto di vista chirurgico, per il glioblastoma, l'identificazione di un pattern meccanico che consenta di discriminare tessuto patologico da tessuto sano permettendo di individuare una sorta di "margine" della lesione è di chiara rilevanza e, avvalendosi di strumenti chirurgici dotati di micro-AFM, potrebbe essere utilizzata in futuro intra-operatoriamente per guidare il neurochirurgo nella pratica dell'asportazione del principale e più aggressivo tumore cerebrale maligno. In virtù della differente natura e modalità di crescita dei meningiomi rispetto ai glioblastomi, l'identificazione di marcatori che consentano di rilevare l'interfaccia meningioma- parenchima cerebrale sano potrebbe non avere la stessa rilevanza clinica. Piuttosto sarebbe molto utile individuare quei meningiomi dotati di un potenziale maggiormente aggressivo. In particolare, avvalendosi in futuro dell'ausilio di micro-AFM intra-operatori, sarebbe possibile identificare in sede di asportazione chirurgica i meningiomi con caratteristiche aggressive per valutare la possibilità di spingersi verso la radicalità chirurgica anche per quei tumori localizzati in aree anatomicamente sfavorite, riducendo così il rischio di recidiva e di progressione neoplastica.

Oltre alla *stiffness*, in questo studio abbiamo esaminato le proprietà viscoelastiche e quelle adesive dei campioni tumorali per stabilire un profilo specifico relativo anche a queste caratteristiche meccaniche, che possa essere d'aiuto nella pratica clinica e chirurgica.

GLIOMI CEREBRALI

I gliomi sono tumori del sistema nervoso centrale che originano dalle cellule della glia e comprendono gli astrocitomi, gli oligodendrogliomi e gli ependimomi. I gliomi costituiscono oltre il 30% dei tumori del sistema nervoso centrale e l'80% dei tumori cerebrali maligni.⁵¹

I gliomi maligni sono tumori cerebrali primitivi, altamente invasivi ma che non metastatizzano al di fuori del sistema nervoso centrale. La sopravvivenza media dei pazienti con glioma cerebrale va dai 6 mesi ai 2 anni a seconda di vari parametri correlati al paziente, al tumore e al trattamento adottato.⁵² Il carattere altamente aggressivo dei gliomi, in particolare del glioblastoma multiforme che costituisce il sottotipo più aggressivo, si caratterizza per la loro diffusa infiltrazione nel parenchima cerebrale sano circostante e per l'interazione con i componenti della matrice extracellulare del cervello. Le terapie standard adottate per il trattamento di questi tumori, che includono la chirurgia seguita da radioterapia e chemioterapia, non sono risultate efficaci per eradicare singole cellule di glioma. Queste cellule sono responsabili della recidiva neoplastica ai margini della lesione asportata oppure, migrando nel cervello normale, costituiscono nuovi focolai tumorali recidivi a distanza. Le cellule di glioma sono infatti localmente invasive e, durante la loro migrazione attraverso la matrice extracellulare per diversi millimetri o centimetri rispetto alla lesione principale, danno origine a tumori recidivi che insorgono a distanza dalla lesione primaria.⁵³ Il percorso infiltrativo del glioma nel parenchima cerebrale normale coinvolge la membrana basale dei vasi sanguigni e le fibre nervose mieliniche della sostanza bianca.^{38,54} Il modello d'invasione delle cellule di glioma è legato alla composizione unica del microambiente extracellulare cerebrale, che viene rimodellato durante l'invasione ad opera di metalloproteasi della matrice.⁵⁵ Durante il processo di invasione neoplastica, vengono inoltre secrete nuove molecole della matrice extracellulare ed espressi recettori di adesione dal glioma promuovendo così l'interazione e la comunicazione (*signaling*) fra cellula di glioma e matrice extracellulare. Questi rimodellamenti inducono delle modificazioni meccaniche del microambiente extracellulare e, in particolare, la principale caratteristica del microambiente extracellulare coinvolta nello sviluppo del glioma sembra essere la forza meccanica determinata dalla rigidità della matrice extracellulare stessa. Questo aspetto ha un ruolo di fondamentale importanza nella genesi e nella diffusione delle neoplasie cerebrali. È stato dimostrato che una matrice extracellulare più rigida promuove la migrazione e la proliferazione del glioma, al contrario una minore rigidità della matrice (simile a quella del cervello normale) avrebbe un effetto opposto.³⁷

1.1 Caratteristiche patologiche

La popolazione cellulare del sistema nervoso centrale è costituita, oltre che da neuroni, da cellule gliali, dette anche cellule della glia o neuroglia. Nel cervello umano le cellule gliali rappresentano l'85% dell'intera popolazione cellulare e si dividono in macroglia, che ha origine dal neuroectoderma ed è composta da astrociti, oligodendrociti e ependima, e microglia. Il termine glia (dalla parola greca che significa "colla") riflette la supposizione del XIX secolo che queste cellule mantenessero insieme il sistema nervoso in qualche modo. La parola è sopravvissuta, nonostante la mancanza di prove che tra le molte funzioni delle cellule gliali vi sia quella di tenere vincolate insieme le cellule nervose.⁵⁶ Ad oggi è ben noto e consolidato il ruolo di supporto per i neuroni della neuroglia. Le funzioni principali delle cellule della glia comprendono la regolazione del metabolismo energetico (mantenimento dell'ambiente ionico delle cellule nervose, modulazione della velocità di propagazione del segnale nervoso, modulazione dell'azione sinaptica controllando l'*uptake* dei neurotrasmettitori), fornire un'impalcatura per alcuni aspetti dello sviluppo neuronale e le reazioni di riparazione in risposta a lesioni neurali e infiammazione del tessuto.⁵⁶

1. Gliomi cerebrali

Gli astrociti sono il tipo più abbondante di cellule della neuroglia, si trovano sia nella sostanza bianca sia in quella grigia e devono il loro nome al fatto che possiedono numerose estroflessioni che gli forniscono un aspetto a stella (da qui il prefisso "astro"). Gli astrociti interagiscono sia con i neuroni sia con i vasi sanguigni e si ritiene che agiscano da fornitori di substrati metabolici e isolanti elettrici verso i neuroni, e che partecipino alle funzioni della barriera emato-encefalica.

Gli oligodendrociti producono un rivestimento ricco di lipidi attorno ad alcuni, ma non tutti, gli assoni, avvolgendoli in un involucro noto come guaina mielinica, importante nella velocità di conduzione del potenziale d'azione. La guaina mielinica isola, infatti, l'assone permettendo una migliore e più rapida propagazione dei segnali elettrici.

Le cellule ependimali delimitano le cavità del sistema nervoso centrale. L'ependima è il sottile epitelio che riveste i ventricoli cerebrali ed è implicato nella produzione del liquido cerebrospinale.

La microglia, come suggerisce il nome, è costituita da cellule più piccole che originano dal mesoderma; la sua funzione principale è quella di agire come sistema macrofagico che si attiva in risposta ad una lesione. L'attivazione delle cellule microgliali prevede la proliferazione e la formazione di aggregati attorno al tessuto necrotico e ai neuroni in degenerazione.

I Gliomi prendono il nome dal tipo cellulare specifico con cui condividono caratteristiche istologiche e da cui solitamente originano: astrocitomi dagli astrociti, oligodendrogliomi dagli oligodendrociti, gliomi misti quali gli oligoastrocitomi presentano elementi cellulari sia astrocitari sia oligodendrogliali, ed ependimomi dalle cellule ependimali (Tabella 1.1).

	I	II	III	IV
Astrocytic tumours				
Subependymal giant cell astrocytoma	*			
Pilocytic astrocytoma	*			
Piloxyoid astrocytoma		*		
Diffuse astrocytoma		*		
Pleomorphic xanthoastrocytoma	*			
Anaplastic astrocytoma			*	
Glioblastoma				*
Giant cell glioblastoma				*
Gliosarcoma				*
Oligodendroglial tumours				
Oligodendroglioma		*		
Anaplastic oligodendroglioma			*	
Oligoastrocytic tumours				
Oligoastrocytoma		*		
Anaplastic oligoastrocytoma			*	
Ependymal tumours				
Subependymoma	*			
Myxopapillary ependymoma	*			
Ependymoma		*		
Anaplastic ependymoma			*	
Choroid plexus tumours				
Choroid plexus papilloma	*			
Atypical choroid plexus papilloma		*		
Choroid plexus carcinoma			*	
Other neuroepithelial tumours				
Angiocentric glioma	*			
Chordoid glioma of the third ventricle		*		
Neuronal and mixed neuronal-glial tumours				
Gangliocytoma	*			
Ganglioglioma	*			
Anaplastic ganglioglioma			*	
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	*			
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	*			
Central neurocytoma				
Central neurocytoma		*		
Extraventricular neurocytoma		*		
Cerebellar liponeurocytoma		*		
Paraganglioma of the spinal cord	*			
Papillary glioneuronal tumour	*			
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	*			
Pineal tumours				
Pineocytoma	*			
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation		*	*	
Pineoblastoma				*
Papillary tumour of the pineal region	*	*	*	
Embryonal tumours				
Medulloblastoma				*
CNS primitive neuroectodermal tumour (PNET)				*
Atypical teratoid / rhabdoid tumour				*
Tumours of the cranial and paraspinal nerves				
Schwannoma	*			
Neurofibroma	*			
Perineurioma	*	*	*	
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)		*	*	*
Meningeal tumours				
Meningioma	*			
Atypical meningioma		*		
Anaplastic / malignant meningioma			*	
Haemangiopericytoma		*		
Anaplastic haemangiopericytoma			*	
Haemangioblastoma	*			
Tumours of the sellar region				
Craniopharyngioma	*			
Granular cell tumour of the neurohypophysis	*			
Pituitaryoma	*			
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis	*			

Tabella 1.1 Classificazione secondo WHO dei tumori del sistema nervoso centrale.⁵⁷ I gliomi sono suddivisi in base al tipo cellulare di origine e a ciascuno è assegnato un grado di malignità dal I al IV.

1. Gliomi cerebrali

È largamente accettata e diffusa la classificazione di aggressività in 4 gradi proposta dalla World Health Organization (WHO)⁵⁷ che si basa sul riscontro o meno di quattro caratteristiche istologiche indice di malignità: atipia nucleare, presenza di mitosi, proliferazione endoteliale e necrosi. Secondo questa classificazione, i tumori sono distinti in gliomi di basso grado (WHO – grado I e II), ben differenziati, esibiscono un comportamento benigno e si associano ad una prognosi migliore, e gliomi di alto grado (WHO – grado III e IV), indifferenziati o anaplastici, questi sono tumori maligni associati a prognosi infausta (Tabella 1.1).

Tuttavia anche i gliomi di basso grado possono recidivare e andare in contro a modificazioni nel tempo con un aumento del grado istologico tale da doverli considerare maligni.

I gliomi di basso grado sono più frequenti dai 20 ai 40 anni, mentre i cosiddetti gliomi anaplastici o “maligni” hanno un’insorgenza in genere più tardiva, dai 40 ai 70 anni. Oltre i 70 anni il glioblastoma multiforme è la forma più frequente (Tabella 1.2).⁵⁸

Gliomi di basso grado	Astrocitoma grado I e II	4%
	Oligodendroglioma grado II	4%
Gliomi di alto grado (Gliomi maligni)	Astrocitoma anaplastico grado III	35%
	Glioblastoma multiforme grado IV	50%
	Oligoastrocitoma anaplastico grado III	4%
	Oligodendroglioma anaplastico grado III	2%
Altri	Ependimoma, ependimoma anaplastico, etc.	Rari

Tabella 1.2 Neoplasie gliali: distribuzione relativa nell’adulto.⁵⁸

Con riferimento al sottotipo istologico, gli astrocitomi sono i gliomi più comuni, rappresentando circa il 75% di tutti i gliomi. Fra gli astrocitomi, il glioblastoma multiforme è il glioma più frequente (Fig. 1.1), costituendo da solo oltre il 55% di tutti i gliomi.²⁸

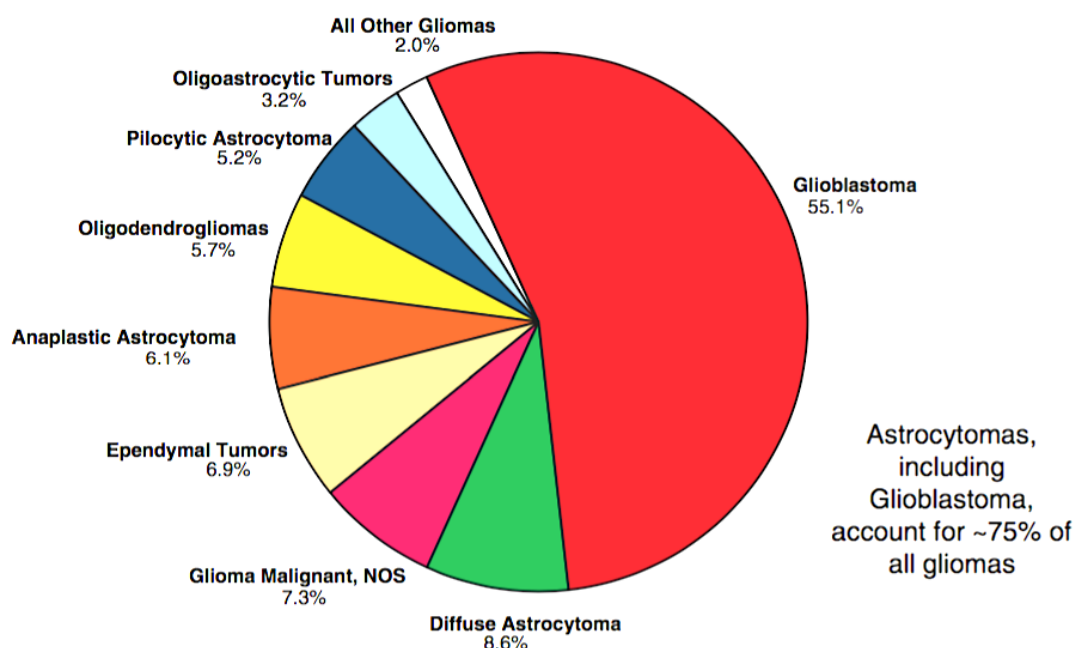


Fig. 1.1 Distribuzione dei gliomi in base al sottotipo istologico.²⁸

1.1.1 Anomalie genetiche e biologia molecolare nei gliomi

Recentemente, grazie alle attuali conoscenze nell'ambito della genetica molecolare, alla tradizionale definizione istopatologica delle neoplasie gliali, si è affiancata una dettagliata caratterizzazione molecolare, mediante l'uso di marcatori dotati di valore predittivo e prognostico. È anche prevista una nuova versione della classificazione WHO dei tumori del sistema nervoso centrale che incorpora i marcatori tumorali e che dovrebbe essere rilasciata entro il 2016.⁵⁹

MGMT.

Il gene MGMT (metilguanina metiltransferasi) è collocato nel locus 10q26 e codifica per una proteina del sistema di riparazione del DNA, la O6-metilguanina DNA-metiltransferasi, che rimuove gruppi alchilici potenzialmente mutageni dalla posizione O6 delle basi guaniniche, un importante sito di alchilazione.⁶⁰ La riparazione del DNA consuma la proteina MGMT, il cui livello deve essere ripristinato per garantire l'omeostasi cellulare. Nel caso in cui invece il danno alle basi nucleotidiche non venga corretto, esso induce morte cellulare per necrosi o apoptosi. Un elevato livello di attività di MGMT nella cellula tumorale annulla quindi l'effetto terapeutico degli agenti alchilanti producendo un fenotipo resistente. Il silenziamento epigenetico del gene MGMT attraverso la metilazione del promotore si associa a perdita della sua espressione e conseguentemente il meccanismo di riparo del DNA viene inficiato. Vari studi hanno dimostrato che la metilazione del promotore del gene MGMT si associa ad un prolungamento della sopravvivenza dei pazienti in terapia (radioterapia e chemioterapia con temozolomide).⁶¹⁻⁶⁹

Co-delezione dei cromosomi 1p/19q.

Questa anomalia cromosomica caratterizza fortemente le neoplasie oligodendrogliali. La codelezione è presente nello 0-10% degli astrocitomi, nel 21-59% degli oligoastrocitomi e nel 39-70% degli oligodendrogliomi. Le anomalie di 1p/19q sono più frequenti nelle neoplasie oligodendrogliali a sede frontale, occipitale e parietale, rispetto a quelle temporali, insulari e diencefaliche.⁵⁸ La presenza della co-delezione 1p/19q è un potente fattore prognostico positivo e andrebbe sempre ricercato poiché conferisce non solo una prognosi favorevole ma anche una predittività ed indicazione alla chemioterapia.^{68,70}

IDH1-IDH2.

Un'analisi estesa del genoma ha evidenziato che mutazioni somatiche nel codone 132 del gene della isocitrato deidrogenasi di tipo 1 sono presenti nel 12% dei glioblastomi.⁷¹ Tale gene codifica per una carbossilasi che converte l'isocitrato in ketoglutarato, con produzione di NADPH; quest'ultimo riduce il glutatione, che funge da antiossidante nel metabolismo cellulare. La forma mutante dell'enzima porta alla formazione di un substrato, il 2-idrossiglutarato, che rappresenta un oncometabolita in grado di modificare lo stato di metilazione del DNA. Su tale evidenza fu condotto uno studio con lo scopo di valutare la prevalenza delle mutazioni a carico dei loci di IDH1 e IDH2, quest'ultimo codificante per un prodotto enzimatico con funzione analoga. Lo studio ha rilevato che le mutazioni erano presenti nel 90% degli astrocitomi diffusi, nella totalità degli oligoastrocitomi e degli oligodendrogliomi, nel 85% dei glioblastomi secondari, nel 5% dei glioblastomi de novo, nello 0% dei glioblastomi pediatrici e degli astrocitomi pilocitici. I pazienti con astrocitoma anaplastico e glioblastoma con IDH1 e IDH2 mutati erano significativamente più giovani di quelli privi di mutazione.⁷² La mutazione di IDH rappresenta un potente fattore prognostico, i pazienti con IDH1 e IDH2 mutati hanno una prognosi migliore se comparati con quelli che possiedono il gene IDH *wild-type*.⁷³

ATRX.

Recentemente, mutazioni con perdita di funzione a carico del gene responsabile della sindrome *X-linked* alfa talassemia/ ritardo mentale (ATRX) sono state descritte nei gliomi anaplastici.⁷⁴ Questo gene codifica per una proteina (anch'essa ATRX) implicata nella regolazione del rimodellamento della cromatina.⁷⁵ Nei pazienti con gliomi della linea

astrocitaria mutazioni a carico del gene ATRX sembrerebbero associarsi ad una prognosi migliore.^{76,77}

I dati di sequenziamento presentati dal Cancer Genome Atlas Research Network⁷⁸ hanno inoltre rivelato anomalie genomiche nel glioblastoma che si riferiscono a diverse vie di segnalazione, come quella del fattore di crescita epidermico (EGFR) / Ras / PI3K, note per essere associate con segnalazione correlata alla matrice extracellulare.³⁷ Inoltre, l'analisi genomica integrata ha identificato sottotipi clinicamente rilevanti di glioblastoma con caratteristiche anomalie del *platelet derived growth factor receptor A* (PDGFRA), della neurofibromina 1 (NF1), e ha confermato le mutazioni dell'EGFR in tutti i sottotipi di glioblastoma.⁷⁹

1.2 Indicazioni chirurgiche

L'asportazione chirurgica dei gliomi è il trattamento di prima scelta.

Nei gliomi di basso grado la resezione totale o subtotale riduce l'incidenza di recidive e il rischio di trasformazione maligna, migliorando la sopravvivenza libera da progressione di malattia e la sopravvivenza globale.^{80,81} La maggior parte degli autori concorda per l'intervento chirurgico anche in pazienti asintomatici con lesioni facilmente aggredibili.

Per i gliomi di alto grado l'importanza dell'entità della resezione chirurgica è stata confermata dal *Glioma Outcomes Project*, che tra il 1997 e i 2001 ha arruolato 788 pazienti operati con diagnosi di glioma di grado III e IV; l'obiettivo primario dello studio era stabilire la sopravvivenza dei pazienti. Lo studio ha evidenziato che la resezione chirurgica verso la sola biopsia, un'età inferiore ai 60 anni e un *Karnofsky Performance Status* superiore a 70, erano associati, in modo statisticamente significativo, ad un aumento della sopravvivenza.⁸²

I benefici di un approccio chirurgico "radicale" sono molteplici: produce un sensibile miglioramento clinico alleviando i sintomi dovuti ad aumentata pressione endocranica e a compressione; riduce il carico tumorale, aumentando l'ossigenazione del residuo con conseguente potenziamento della risposta alla radioterapia; un minore residuo tumorale rallenta inoltre la comparsa di chemio-resistenza. Un'analisi retrospettiva su pazienti affetti da glioblastoma ha evidenziato come l'asportazione di almeno il 98% della lesione macroscopica produca un vantaggio significativo in termini di sopravvivenza.⁸³

1.3 Glioblastoma multiforme e limiti dell'asportazione chirurgica

Il glioblastoma multiforme (GBM) è la neoplasia cerebrale più aggressiva e più frequente: la sua incidenza media è di 5-8 casi ogni 100.000 abitanti e rappresenta il 55% rispetto al totale di tutti i gliomi diagnosticati.^{28,84} È un tumore dell'età adulta-anziana, con età media alla diagnosi di 64 anni.²⁸ I sintomi più comuni al momento dell'esordio clinico sono spesso causati da un incremento della pressione intracranica, deficit focali (in relazione alla sede della lesione ed associati ad edema perilesionale) e crisi comiziali. Per molti pazienti la diagnosi viene posta alcune settimane dopo la comparsa dei sintomi iniziali, soprattutto nei pazienti con cefalea intermittente o deficit motori o cognitivi sfumati. Ovviamente un primo episodio di crisi epilettiche e/o la comparsa di sintomi neurologici focali rendono necessaria l'esecuzione di una TC o RM con mezzo di contrasto.

I glioblastomi si presentano radiologicamente come lesioni con presa di contrasto irregolare (spesso con aspetto di iperintensità ad anello con centro necrotico), dopo iniezione di gadolinio nelle immagini T1-pesate.

Dal punto di vista anatomo-patologico i glioblastomi sono caratterizzati dall'infiltrazione del tessuto cerebrale circostante (cellule tumorali possono essere ritrovate anche a distanza di parecchi centimetri dalle aree con presa di contrasto), dalla presenza di necrosi e dalla marcata proliferazione dell'endotelio.⁸⁵

La prognosi dei pazienti affetti da glioblastoma è infausta, con mediane di sopravvivenza intorno a 12-18 mesi e meno del 10% dei pazienti che sopravvive oltre i 5 anni, nonostante i trattamenti terapeutici, sebbene le nuove conoscenze di biologia molecolare e citogenetica

abbiano permesso di differenziare particolari sottogruppi di pazienti con prognosi significativamente migliore (si veda paragrafo precedente).

Generalmente il primo passo del trattamento dei glioblastomi è la massima asportazione chirurgica “sicura”.⁸⁶ È ormai nota l'importanza dell'entità della resezione chirurgica.⁸² I benefici di un approccio chirurgico “radicale” sono molteplici (come descritto in precedenza) e l'asportazione macroscopicamente totale della lesione si associa ad un significativo vantaggio in termini di sopravvivenza.⁸³ Il vantaggio in termini prognostici nei pazienti sottoposti a resezione macroscopicamente totale risulta purtroppo limitato da quelle che sono le caratteristiche intrinseche di crescita di questo tumore. Tipicamente i glioblastomi si caratterizzano per la crescita di tipo infiltrativa nei confronti del parenchima circostante, tale da non permettere l'identificazione chirurgica di un piano di clivaggio fra tumore e tessuto cerebrale sano. Questo aspetto correla con una duplice problematica. In primo luogo la mancanza di una ben definita interfaccia tumore-tessuto sano aumenta la difficoltà di individuare il tessuto patologico ai margini della lesione, tessuto che spesso, peraltro, appare simile a quello sano, rischiando così un'asportazione subtotale; in secondo luogo, proprio questa difficoltà nel discriminare i margini del tumore spinge il chirurgo ad essere cauto per non trovarsi ad asportare parenchima cerebrale oltre il necessario, aumentando il rischio di deficit neurologici associati all'asportazione chirurgica stessa.

Vi è comunque comune accordo sul fatto che sulle lesioni aggredibili chirurgicamente l'intervento deve sempre essere effettuato, anche perché è generalmente seguito da un rapido miglioramento sintomatologico.^{87,88} Fanno eccezione gravi compromissioni del *performance status* pre-operatorio. Per gli interventi chirurgici in aree eloquenti, ad alto rischio di morbidità post-operatoria, è possibile avvalersi di tecniche chirurgiche quali *l'awake surgery* e il *mapping* corticale.^{89,90}

La chirurgia seguita dalla radioterapia rappresenta il trattamento d'elezione dei pazienti affetti da glioblastoma.⁹¹ Solitamente la radioterapia viene affiancata dalla chemioterapia. La determinazione dello stato di metilazione del promotore del gene MGMT può essere utile in quanto rappresenta sia un fattore prognostico sia un fattore predittivo di risposta alla chemioterapia e può essere di aiuto nelle scelte terapeutiche nell'interpretazione dei quadri clinici e neuroradiologici. Per quanto concerne la chemioterapia, lo standard terapeutico per i pazienti con glioblastoma è temozolomide (75 mg/m²/die) per tutta la durata della radioterapia (60 Gy/30 frazioni) per un massimo di 7 settimane seguita da 6 cicli di temozolomide adiuvante (150-200 mg/m² x 5 giorni, ogni 28).⁶¹ I pazienti trattati con temozolomide concomitante alla radioterapia e, a seguire, adiuvante hanno ottenuto un miglioramento statisticamente significativo del tempo alla progressione neoplastica, della sopravvivenza mediana e della sopravvivenza a 2 e a 4 anni.^{61,64}

Il trattamento concomitante con temozolomide può portare ad un potenziamento degli effetti della radioterapia. Ciò può tradursi in un aumento della necrosi nelle lesioni tumorali ed in una maggiore rottura della barriera ematoencefalica, dando luogo a quadri neuro-radiologici di “pseudo progressione” neoplastica, pressoché indistinguibili dalle reali progressioni di malattia. Tale fenomeno è presumibilmente legato alla necrosi indotta dai trattamenti citotossici. È pertanto consigliata prudenza nella valutazione neuroradiologica della progressione di malattia ad un mese dal termine della terapia concomitante per evitare di interpretare erroneamente una radionecrosi come una recidiva di malattia.

Per i glioblastomi la recidiva è un evento pressoché inevitabile. Solitamente la recidiva insorge dentro e ai margini del cavo chirurgico (Fig. 1.2), ma può presentarsi anche a distanza.

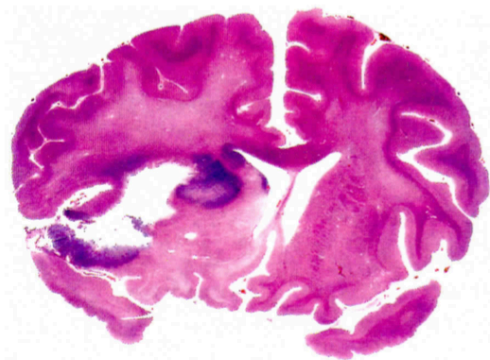


Fig. 1.2 Glioblastoma recidivo. Apprezzabile come zona viola più scura in una sezione colorata con cresil violetto, il glioblastoma solitamente recidiva all'interno e ai margini del letto tumorale originale.

Dopo trattamento concomitante ed adiuvante circa il 20% dei pazienti possono sviluppare una recidiva di malattia al di fuori del campo di radioterapia. La recidiva fuori campo è più tardiva rispetto alla recidiva locale, soprattutto nei pazienti che presentano la metilazione di MGMT.⁹²

La progressione inesorabile di questa malattia è dovuta in gran parte al suo peculiare comportamento biologico. L'infiltrazione diffusa di cellule del tumore primario nel parenchima cerebrale circostante o in regioni lontane del cervello rende la resezione chirurgica completa della massa tumorale praticamente impossibile e quasi inevitabilmente lascia il paziente suscettibile di recidiva, portandolo tipicamente a morte entro anni 1 o 2 anni dalla diagnosi.

Questa invasione aggressiva è un segno distintivo dei gliomi maligni e della loro capacità di diffondere ed è ampiamente considerato come uno dei principali ostacoli allo sviluppo di terapie di successo.⁹³

È ben noto che il microambiente extracellulare gioca un ruolo essenziale nella definizione del contesto che permette al tumore di crescere, infiltrarsi e diffondere.⁹⁴

Diverse evidenze suggeriscono che l'insolita aggressività del glioblastoma multiforme possa essere mediata dal suo modello unico d'interazione con la matrice extracellulare del cervello.²⁹ In particolare, i glioblastomi mostrano un andamento sorprendentemente diverso per quanto concerne l'invasione del tessuto cerebrale rispetto ai tumori maligni sistemici che metastatizzano al cervello. I glioblastomi invadono prontamente il tessuto cerebrale compresa la materia bianca, che è invece altamente resistente all'invasione da parte di tumori metastatici non gliali.⁹⁵ Al contrario, i glioblastomi non invadono le pareti dei vasi sanguigni, a differenza dei tumori metastatici sistemici,⁹⁶ e molto raramente metastatizzano al di fuori del cervello ad altri organi. Questo comportamento può essere dovuto in parte al fatto che la matrice extracellulare del cervello è altamente specializzata e distinta da quella di altri tessuti del corpo umano.^{97,98} Vi è un crescente consenso nel ritenere che le cellule tumorali stesse esercitino forze e siano in grado di rimodellare la matrice extracellulare circostante modificandone le proprietà biomeccaniche e influenzando in tal modo la progressione del tumore.^{30,99}

1.4 Matrice extracellulare nel parenchima cerebrale sano

Nel sistema nervoso centrale (SNC) approssimativamente soltanto il 15-25% del volume è occupato dallo spazio extracellulare, mentre la maggior parte del volume del SNC consiste di elementi cellulari quali neuroni, glia, processi astrocitici e vasi sanguigni.^{100,101} I componenti presenti all'interno dello spazio extracellulare comprendono vari ioni, metaboliti, neuro-ormoni, peptidi e molecole della matrice extracellulare prodotti da neuroni e glia. L'ambiente della matrice extracellulare (ECM – *Extracellular Matrix*) del cervello normale contiene alti

livelli di molecole carboidratiche di riempimento spaziale non legate a proteine come il grande glicosaminoglicano acido ialuronico. L'acido ialuronico (HA) si lega a specifici recettori sulla superficie delle cellule, come la molecola di adesione CD44 (Cluster of Differentiation 44) e il recettore per la motilità acido ialuronico mediata (RHAMM), regolando proprietà della ECM e del tessuto quali, ad esempio, la proliferazione, l'adesione, la motilità. Molecole di carboidrati legati a proteine, presenti nel cervello normale in alte concentrazioni, includono proteoglicani solforati quali i proteoglicani condroitin solfato ed eparan solfato. I proteoglicani si trovano spesso legati alle catene di acido ialuronico per mezzo della loro proteina *core*.

Le proteine fibrose associate alle membrane basali del sistema vascolare del cervello comprendono collagene, fibronectina e laminina.¹⁰² I livelli di queste proteine fibrose nel cervello normale sono bassi rispetto al tessuto connettivo al di fuori del sistema nervoso centrale.^{29,101,103} Tuttavia, il microambiente ECM del glioma differisce da quello del cervello normale e varia a seconda del grado del glioma, ad esempio in presenza dell'aggressivo GBM, producendo collagene, fibronectina o laminina.¹⁰⁴

Diverse classi di molecole della matrice extracellulare svolgono un ruolo importante nel normale sviluppo del SNC ma hanno funzioni alterate in presenza di glioma e vengono di seguito segnalate.

In primo luogo, l'acido ialuronico svolge molteplici ruoli nel fornire una organizzazione della matrice pericellulare.

I proteoglicani condroitin solfato (CSPG), espressi ad alti livelli nelle regioni cerebrali del feto in via di sviluppo, ritornano ad essere espressi più tardi nel cervello maturo in astrociti e neuroni.^{54,101} Essi costituiscono una delle più importanti famiglie di glicoproteine della matrice leganti l'acido ialuronico nel sistema nervoso centrale, soprattutto la sottoclasse di lectinani fra i quali ricordiamo: aggrecan, versican, neurocan, BEHAB/brevican (*brain enriched hyaluronic acid binding protein*). Una seconda famiglia di proteoglicani che legano l'acido ialuronico nel SNC sono le proteine leganti acido ialuronico e proteoglicani (HAPLN) chiamate anche "*link proteins*", che legano sia HA sia lectinani. I lectinani contengono domini di lectina e domini leganti acido ialuronico e fungono da leganti per i componenti della ECM. Oltre che all'acido ialuronico, si legano ai recettori della superficie cellulare regolando molti processi all'interno del SNC durante lo sviluppo, quali la motilità cellulare e la navigazione assonale.¹⁰⁵ Alcuni lectinani, come i versicani, sono noti per esser prodotti dalle cellule gliali e cellule staminali neurali.¹⁰⁶

Un altro membro dei proteoglicani condroitin solfato è il phosphacan, un proteoglicano astrogliale che si lega a molecole di adesione cellulari neurali e tenascina-C.

La proteina neurogliale 2 (NG2), anch'essa un proteoglicano CSPG, nota come marcatore caratteristico delle cellule progenitrici degli oligodendrociti e periciti nello sviluppo vascolare, è espressa da molti gliomi. Le cellule NG2 positive sono state suggerite essere le cellule d'origine del glioma.¹⁰⁷

Le tenascine-C e -R, una famiglia di glicoproteine presenti nella matrice extracellulare come insieme di diverse subunità espresse nelle zone di proliferazione, migrazione e morfogenesi, svolgono un ruolo importante nel sistema nervoso centrale in via di sviluppo. Ad esempio, la tenascina-C è stata trovata espressa in alte concentrazioni nella zona subventricolare ed è risultata essenziale per lo sviluppo delle cellule staminali neurali.¹⁰²

Le galectine (Gal), lectine leganti mannosio, sono proteine leganti glicani trovate all'interno e all'esterno delle cellule. Gal-1 è altamente rappresentata nel sistema nervoso centrale e partecipa allo sviluppo delle reti neurali e non-neuronali e Gal-3 interagisce con altre glicoproteine derivate dal tessuto neurale ed è espressa da astrociti e cellule endoteliali.¹⁰¹ Il ruolo di molti componenti della matrice extracellulare del cervello normale sopra descritti sono alterati drammaticamente nel glioma.

Nel cervello normale, i complessi della matrice extracellulare contenenti acido ialuronico e proteoglicani, come versican, brevican, neurocan, aggrecan, phosphacan e tenascina-C,

tenascina-R, e *link proteins* formano i domini ECM chiamati reti perineuronali descritti per la prima volta da Camillo Golgi nel 1893. Questi aggregati perineuronali avvolgono i corpi cellulari neuronali e i dendriti prossimali di alcuni neuroni e riempiono lo spazio tra i neuroni e i processi gliali. È stato proposto che le reti perineuronali all'interno del cervello sono più eterogenee e comprendono strutture chiamate "*interstitial clefts*".¹⁰⁸ Come descritto da Brightman,¹⁰⁸ queste fenditure interstiziali composte da pareti astrocitarie, lamina basale e molecole della matrice extracellulare possono variare in termini di dimensioni, forma e contenuti a seconda della regione cerebrale. Inoltre, la dimensione ed il contenuto delle fenditure interstiziali è risultato essere diverso nel cervello maturo dove appaiono più strette, con limitata capacità di movimento delle cellule rispetto a quella nel cervello fetale. Nel cervello fetale le dimensioni e il contenuto delle fenditure interstiziali permettono la migrazione cellulare e la crescita dei neuriti mentre, nel cervello maturo, la migrazione cellulare nelle fessure interstiziali può avvenire solo dopo la degradazione enzimatica della matrice extracellulare.¹⁰⁸

Nel cervello normale alcune regioni sono particolarmente ricche di matrice extracellulare. Queste regioni cerebrali includono lo spazio subaracnoideo, gli spazi subependimali, gli organi circumventricolari forniti da capillari fenestrati privi di barriera emato-encefalica, e lo spazio perivascolare intorno alle arteriole e alle venule. Questi vasi sono associati con lo spazio del tessuto connettivo stromale e fiancheggiati da lamine basali contenenti proteoglicani eparan solfato, i quali sono anche componenti delle interfacce ependimale, astrogliale, ed endoteliale nel sistema nervoso centrale, comprese le fenditure interstiziali.

Nicchia cerebrale delle cellule staminali della matrice extracellulare

Nel sistema nervoso centrale, la capacità delle cellule staminali normali di auto-rinnovarsi e di differenziarsi in specifici tipi cellulari è controllato dal microambiente di una zona del sistema nervoso centrale in cui queste cellule risiedono che è chiamata nicchia. Analogamente, in altri tessuti e organi, le cellule staminali si trovano nel microambiente protettivo di nicchie, composte da molecole della matrice extracellulare e da vari tipi di cellule differenziate che rilasciano fattori di regolazione e forniscono un contatto diretto con le cellule staminali mantenendo la loro quiescenza. Il microambiente della nicchia delle cellule staminali neurali (NSC – *Neural Stem Cells*) è anche chiamato nicchia vascolare, perché le cellule staminali si concentrano nei pressi dei vasi sanguigni. La nicchia del sistema nervoso centrale è costituita da diversi componenti della matrice extracellulare, e include la lamina basale e le cellule endoteliali dei vasi.¹⁰⁹ Queste cellule endoteliali vascolari differenziate mature hanno una associazione intima con le cellule staminali e svolgono un ruolo regolatore nella nicchia attraverso la secrezione di fattori solubili.

1.5 Matrice extracellulare nel glioma

1.5.1 Matrice extracellulare e rigidità meccanica nel glioma

Esistono variazioni anatomiche nella *stiffness* del normale parenchima cerebrale,¹¹⁰ con la membrana basale dei vasi sanguigni e i tratti di fibre mieliniche della sostanza bianca che presentano una rigidità meccanica superiore³⁸ ed entrambi questi aspetti vengono utilizzati come percorso infiltrante per l'invasione del glioma.^{37,54,111} È stato osservato per la prima volta in vitro che la migrazione indirizzata dei fibroblasti si verifica da zone morbide a zone rigide della matrice extracellulare, un fenomeno chiamato *meccanotassi*.¹¹² Un'osservazione simile era stata fatta per il glioblastoma dove variazioni di rigidità della ECM possono sia diminuire sia aumentare la motilità cellulare e l'entità dell'effetto risultava dipendente dal tipo cellulare.⁴⁰ Si è constatato che un'elevata rigidità della ECM aumenta l'espressione delle proteine che mediano la contrattilità, come Rho.¹ I componenti della ECM sono risultati essere i principali regolatori della motilità cellulare nel cervello. Per esempio, studi precedenti hanno mostrato un effetto stimolatorio di proteine ECM quali fibronectina, collagene,

laminina ed altre sulla migrazione delle cellule di glioma.¹⁰⁴ Ulrich et al. hanno dimostrato che le cellule di glioma coltivate su una matrice extracellulare polimerica rivestita di fibronectina con rigidità meccanica varia ma definita esibiscono alterate morfologia cellulare e organizzazione del citoscheletro.³⁷ Questi autori hanno dimostrato inoltre che le cellule di glioma in coltura su substrati più morbidi presentano una ridotta zona di diffusione, con scomparsa delle fibre di stress e delle adesioni focali. La rigidità dei substrati morbidi utilizzati in questo studio è paragonabile alla rigidità della matrice extracellulare del parenchima cerebrale normale, mentre l'aumento della rigidità è caratteristico del glioma e del suo stroma circostante.

Inoltre, è stato dimostrato che un aumento della rigidità della ECM porta ad un aumento della proliferazione, motilità e diffusione delle cellule. È stato suggerito che le cellule del glioma rimodellino attivamente il loro microambiente trasformandolo da normale ECM cerebrale a una ECM rigida, simil-tumorale.⁴¹ Pertanto si ritiene che le cellule di glioma modifichino la ECM attraverso la degradazione proteolitica della normale matrice cerebrale e la secrezione di nuovi componenti ECM, fornendo così un microambiente più rigido che a sua volta invia segnali biomeccanici che supportano l'invasione delle cellule di glioma.³⁷ Questo è stato osservato in precedenza anche per le cellule invasive del carcinoma mammario.¹¹³ Prendendo di mira sia le vie di segnalazione per la meccanotassi sia lo stesso rimodellamento meccanico, potrebbero essere sviluppati nuovi approcci terapeutici per il trattamento del glioma in grado di modificarne l'invasione e la proliferazione.

1.5.2 Mimetismo vasculogenico nel glioma

Ruolo della matrice extracellulare e delle metalloproteasi nel mimetismo vasculogenico del glioma

È stato osservato da Maniotis et al. che i vasi sanguigni di tumori altamente aggressivi quali il melanoma uveale originano da cellule tumorali, piuttosto che da cellule endoteliali come inizialmente ipotizzato.¹¹⁴ Questo fenomeno definito mimetismo vasculogenico (MV) è stato attribuito in seguito anche ad altri tumori tra cui il glioma.¹¹⁵ Sebbene il meccanismo di MV non potesse essere spiegato a quel tempo, molti studi si sono rivolti alle interazioni fra metalloproteasi (MMP) e matrice extracellulare, in cerca di indizi. È stato suggerito che diversi componenti del microambiente tumorale potessero contribuire allo sviluppo del MV. Ad esempio, si è tenuto conto del clivaggio della laminina da parte delle MMP, dell'aderenza dei canali vascolari di nuova formazione alle cellule tumorali e della differenziazione delle cellule tumorali.¹¹⁶ Tre fattori principali erano sospettati di svolgere un ruolo nel MV: 1) la plasticità delle cellule tumorali maligne, 2) il rimodellamento della ECM ad opera delle MMP secrete dalle cellule tumorali per ottenere spazio per il mimetismo vasculogenico, e 3) il collegamento dei canali neoformati tramite MV con i pre-esistenti vasi sanguigni per acquisire sangue dall'ospite.¹¹⁶ È stato proposto da Maniotis et al.¹¹⁴ che il livello di formazione di canali attraverso il MV fosse direttamente proporzionale al livello di aggressività tumorale e influenzato dalla pressione del fluido interstiziale, un fattore microambientale noto per influenzare l'angiogenesi. I tumori che proliferano rapidamente hanno un'elevata pressione interstiziale e una compromessa circolazione sanguigna. Inoltre, vi è un limitato apporto di sangue dall'ospite a causa della diminuita germinazione delle cellule endoteliali e della diminuita formazione di vasi sanguigni rivestiti da endotelio. Pertanto, le cellule tumorali che formano i canali tramite mimetismo vasculogenico ottengono un sufficiente apporto di sangue per sostenere la crescita del tumore. È stato osservato che i vasi sanguigni che si formano come risultato del MV hanno una struttura diversa rispetto ai normali vasi sanguigni endotelio-rivestiti. I canali MV sono rivestiti da cellule tumorali altamente aggressive e scarsamente differenziate che potrebbero degradare la membrana basale dei vasi sanguigni rilasciando proteasi e migrando così nel tessuto normale. Dati più

recenti supportano questa teoria mostrando che le cellule staminali del glioblastoma esprimono MMP responsabili dell'invasione e della migrazione di queste cellule.¹¹⁷

Terapie anti-vascolari e anti-angiogeniche che hanno utilizzato molecole quali l'angiostatina o l'endostatina che hanno come bersaglio le cellule endoteliali, non hanno mostrato alcun effetto sui tumori con MV. Per superare la mancanza di comprensione dei meccanismi molecolari alla base del MV, sono stati avviati diversi studi in vitro alla ricerca di nuovi approcci terapeutici basati sul concetto di coinvolgimento della ECM nella formazione del MV. Ad esempio, la laminina è stata utilizzata come target in vitro dimostrando che un anticorpo anti-laminina è in grado di inibire la formazione di canali attraverso il MV da parte delle cellule tumorali.¹¹⁸ Altri studi in vitro rivolti verso le MMP di tipo 2 e 9 hanno dimostrato che una loro inibizione è implicata nel fenomeno del MV.¹¹⁶

Microambiente della nicchia vascolare delle cellule staminali di glioma: nuova teoria del mimetismo vasculogenico

Recentemente è stato proposto un nuovo concetto di cellule progenitrici del cancro, note anche come *cancer-initiating cells* o *cancer stem cells* (CSC). Queste CSC multipotenti, autorigeneranti sono altamente cancerogene e resistenti alle terapie convenzionali.¹¹⁹ Le CSC di glioblastoma assomigliano alle normali NSC ed esprimono i marcatori Nestin+/ CD133+ presenti nella popolazione di cellule staminali neurali. Inoltre, le CSC di glioma, in modo simile alle cellule staminali neurali, si concentrano attorno ai vasi sanguigni nelle nicchie vascolari, con facile accesso ai nutrienti, alle molecole di segnalazione e al sistema vascolare stesso come substrato per la migrazione.^{120,121} Tuttavia, le CSC differiscono dalle cellule staminali neurali nella loro distribuzione nel cervello e nella loro capacità di proliferare. Per esempio, le cellule staminali neurali normali, che possiedono un basso tasso di proliferazione, si trovano solo in specifiche regioni del SNC, come l'ippocampo e la zona subventricolare. Al contrario, le CSC di glioma altamente proliferative possono trovarsi distribuite in tutte le regioni del cervello e del cervelletto all'interno dei tumori. È stato proposto che la differenza principale tra le NSC normali e le CSC di glioma possa essere il modo in cui queste cellule vengono modulate dal microambiente della vascolarizzazione all'interno della nicchia.¹²⁰ La nicchia vascolare nei tumori cerebrali è anormale, così da contribuire alla propagazione delle CSC, aumentando in tal modo la crescita tumorale. Inoltre, le cellule endoteliali da questa nicchia vascolare anomala possono interagire con le CSC del tumore cerebrale, come mostrato in vitro, fornendo alcuni fattori di regolazione extracellulare e mantenendo sia la capacità di auto-rinnovamento sia lo stato indifferenziato di queste cellule.¹²⁰ In questo modo la vascolarizzazione del glioma stabilisce un microambiente della nicchia in cui le CSC possono trasmettere e ricevere segnali dalla matrice extracellulare. Ad esempio, è stato dimostrato che dopo stimolazione delle CSC da parte della ECM della nicchia vascolare, le CSC possono secernere il *vascular endothelial growth factor* (VEGF) promuovendo l'angiogenesi e rafforzando in tal modo la crescita tumorale.¹²² Inoltre, la nicchia vascolare si è dimostrata interferire con radiazioni e chemioterapia schermando le CSC e contribuendo alla resistenza ai trattamenti.¹²¹ È stato anche suggerito che il microambiente della nicchia possa giocare un ruolo nella iniziazione tumorale, basando l'ipotesi sull'osservazione che popolazioni di cellule non tumorali possono diventare tumorigeniche in funzione di un certo microambiente.¹²³ Recenti lavori mostrano che le cellule staminali di GBM hanno capacità simili alle normali cellule staminali neurali e vanno incontro alla differenziazione in cellule endoteliali formando la maggior parte dei nuovi vasi sanguigni nei gliomi.¹²⁴⁻¹²⁶ Il blocco del VEGF o il silenziamento del recettore 2 per il VEGF inibisce la maturazione dei progenitori endoteliali tumorali nell'endotelio, ma non ferma la differenziazione delle CSC (cellule CD133+) in cellule endoteliali, come avviene invece attraverso il silenziamento del recettore del precursore neurale, Notch.¹²⁶

1.5.3 Molecole della matrice extracellulare nel glioma

Di seguito sono descritti i principali componenti della matrice extracellulare che giocano un ruolo importante nella proliferazione, invasione e diffusione del glioma.

1.5.3.1 Acido ialuronico e molecola di adesione CD44

Le cellule di glioma producono costitutivamente acido ialuronico e la sua produzione è incrementata durante la proliferazione cellulare,³⁵ promuovendo l'invasione del glioma.³⁶ È stato dimostrato che l'acido ialuronico crea un microambiente che facilita la migrazione, la proliferazione, la sopravvivenza e l'invasione delle cellule di glioblastoma,³²⁻³⁴ inoltre è stato associato con lo stato maligno del glioblastoma allorché, interagendo con recettori di superficie cellulari (principalmente CD44 e RHAMM), induce l'attivazione di un'ampia gamma di vie di segnalazione intracellulari comprese quelle che promuovono la migrazione e l'invasione neoplastica.^{32-34,127} Nel glioblastoma è aumentata l'espressione dell'acido ialuronico sia nello stroma tumorale sia nel margine di avanzamento.^{32-34,128} È interessante notare che il contenuto di acido ialuronico nel glioma, aumentato rispetto a quello rilevabile nel parenchima cerebrale sano, è paragonabile a quello che si riscontra nelle cellule cerebrali embrionali.¹²⁹

L'acido ialuronico è sintetizzato a livello della membrana plasmatica dalle acido ialuronico-sintasi e la sua sintesi può essere incrementata ad opera di diversi fattori di crescita, ad esempio, il fattore di crescita epidermico (EGF).¹³⁰ HA si lega alle proteine leganti HA chiamate ialaderine, che includono il recettore di superficie CD44. Il CD44 è una glicoproteina transmembrana espressa da molti tipi cellulari e dal glioma. CD44 serve come recettore di superficie per molecole ECM quali HA e CSPG.¹³¹

Il recettore CD44 è sovra-espresso nelle cellule di glioma^{132,133} e il suo incremento correla con l'aumento di malignità del tumore e con un ridotto tempo di sopravvivenza medio.^{131,133,134} Il CD44 è stato riscontrato in corrispondenza del bordo di attacco del glioma, all'interfaccia cervello-tumore.¹³⁵ L'interazione HA-CD44 e il distacco del CD44 dalla superficie cellulare sono associati con la motilità delle cellule di glioma, la migrazione e l'infiltrazione nel normale parenchima cerebrale; il distacco del CD44 è mediato dall'acido ialuronico stesso e accompagnato da una up-regolazione dell'espressione della metalloproteasi MT1 (si veda sezione relativa più avanti).¹³⁶

Dopo il legame al recettore CD44, l'acido ialuronico può essere endocitato, trasportato nei lisosomi e degradato dalle ialuronidasi in piccoli oligosaccaridi dotati di attività stimolante sul glioma.¹³⁷ Mentre nei tessuti tumorali sono stati trovati piccoli frammenti di HA, nel tessuto normale e benigno è stato trovato HA nativo ad alto peso molecolare.¹³⁸ Sia gli elevati livelli del polimero di acido ialuronico di lunghezza completa sia i suoi prodotti di degradazione a basso peso molecolare sono noti come oligosaccaridi che supportano la crescita del glioma.¹³⁷

Gli oligosaccaridi sono in grado di competere con l'acido ialuronico di lunghezza completa per il CD44 recettoriale. È stato osservato che l'acido ialuronico di lunghezza completa e di grandi dimensioni possiede una proprietà anti-angiogenica, mentre gli oligosaccaridi più piccoli, dopo il degrado (3-10 unità disaccaridiche), non possiedono più proprietà anti-angiogenica.¹³⁹ L'oligosaccaride di piccole dimensioni, decamero HA-10, esogenamente aggiunto alla coltura cellulare stimola la produzione di acido ialuronico da parte delle cellule di glioma,³⁵ come descritto per i normali fibroblasti umani,¹⁴⁰ inoltre lo spostamento dell'acido ialuronico nascente dai recettori attraverso gli oligosaccaridi di HA porta alla stimolazione della sintesi di acido ialuronico.¹⁴⁰

1.5.3.2 Condroitin solfato proteoglicani

I condroitin solfato proteoglicani (CSPG) sono espressi in concentrazioni elevate nel cervello in via di sviluppo. Nel cervello normale, essi sono noti per il loro effetto inibitorio sulla migrazione delle cellule staminali. Nel glioma, tuttavia, i condroitin solfato proteoglicani

sono up-regolati e stimolano la migrazione delle cellule di glioma.^{105,141} I due membri della sottoclasse di lecticani, versican e BEHAB/brevican sono espressi in quantità superiori nel glioma rispetto al tessuto cerebrale normale. Essi possono formare complessi con le proteine mesenchimali della matrice presenti nella membrana extracellulare del glioma, ma non nella ECM del cervello normale.¹⁰⁵ Gliomi di vari gradi, ad esempio astrocitomi e glioblastomi, secernono alti livelli di BEHAB/brevican. Il lecticano ha un dominio N-terminale legante acido ialuronico che interagisce con la fibronectina, stimolando così ulteriormente la progressione del glioma.¹⁴² Anche diverse altre molecole della matrice extracellulare, come l'acido ialuronico, il CD44, la tenascina e il *transforming growth factor* $\beta 2$ (TGF $\beta 2$) interagiscono con versican e promuovono l'invasione cerebrale delle cellule tumorali. Recentemente, è stata dimostrata una riduzione delle *link proteins* HAPLN4 e HAPLN2 nei gliomi maligni ed è stato suggerito che questa riduzione possa essere associata al rimodellamento della matrice extracellulare da parte del glioma. Pertanto, in contrasto con il normale tessuto cerebrale dove i proteoglicani condroitin solfato sottoclasse lecticani associati ad HAPLN servono come inibitori della motilità cellulare, nel glioma questo ruolo stabilizzante delle *link proteins* può essere ridotto o perso, risultando una conseguente attività proinvasiva dei condroitin solfato proteoglicani nel glioma.¹⁰⁵

Un altro membro della famiglia dei condroitin solfato proteoglicani, la proteina neurogliale 2 (NG2), è sovra-espressa nel glioma.^{135,143} NG2 espressa dalle cellule di glioma ha una forte associazione con i ligandi della matrice extracellulare come il collagene VI e con ligandi cellulari quali il CD44. Essa è ritenuta implicata nel comportamento invasivo del glioma ed è risultata essere espressa in vitro e in vivo da cellule di glioma altamente migratorie, mentre non è stata trovata in cellule non migratorie.^{107,135,144,145} NG2, oltre ad essere espressa dalle cellule progenitrici degli oligodendrociti e dalle cellule di glioma, è espressa anche dai periciti che sono associati con il microcircolo e possono svolgere un ruolo nello sviluppo del sistema vascolare del glioma.¹⁰⁷ Pertanto NG2, fortemente associata ai ligandi della matrice extracellulare e cellulare, può essere considerata come uno dei principali condroitin solfato proteoglicani coinvolti nella progressione del glioma.

1.5.3.3 Molecole ECM associate alla vascolarizzazione espresse dal glioma

La membrana basale del sistema vascolare cerebrale contiene collagene (tipo IV e V), fibronectina, laminina, vitronectina ed eparan solfato proteoglicani (HSPG) quali glipicani e sindecani. Alcuni HSPG, ad esempio il sindecano-2, sono aumentati nei tumori cerebrali.¹⁴⁶ Laminina, collagene e fibronectina sono espressi dal tessuto cerebrale normale al confine con le cellule di glioma.¹⁴⁷ Inoltre, alcune di queste molecole sono espresse dalle cellule di gliomi altamente aggressivi. Ad esempio, è stato riscontrato che la fibronectina è espressa dal glioblastoma multiforme in vitro e nelle giunzioni gliomesenchimali nei tumori e nei loro vasi sanguigni.⁵⁴ Un'altra molecola, la vitronectina, è risultata espressa nello stadio tardivo del GBM mentre è assente nel cervello normale e nello stadio iniziale del glioma.¹⁴⁸ Le laminine, che sono state trovate nei vasi sanguigni e nelle limitanti esterne gliali nel glioma, sono risultate anch'esse espresse dalle cellule di glioma umano positive per la proteina astrocitica fibrillare gliale (GFAP).¹⁴⁹ Sulla laminina è stato identificato un sito attivo in grado di legarsi al CD44.¹⁵⁰ Inoltre, Ljubimova et al.¹⁵¹ hanno dimostrato che glioblastomi altamente invasivi sovra-esprimono l'isoforma 8 della laminina. Questi autori hanno anche scoperto che la laminina-8, non solo facilita l'invasione tumorale in vitro, ma è anche coinvolta nella ricrescita tumorale dopo il completamento di una terapia. Al contrario, una diversa isoforma, la laminina-9, è stata trovata in gliomi di più basso grado, astrocitomi e, in basse concentrazioni, anche in tumori cerebrali benigni e nel tessuto cerebrale normale. Pertanto, molte di queste molecole della matrice extracellulare, in origine note per essere associate con il sistema vascolare e ora riscontrate espresse a vari livelli dalle cellule di glioma, possono essere considerate come biomarcatori di progressione del glioma.

1. Gliomi cerebrali

La tenascina-C, un proteoglicano sintetizzato dalle cellule gliali e della cresta neurale, è espressa in alte concentrazioni nella zona subventricolare ed è essenziale per lo sviluppo delle cellule staminali neurali. La tenascina-C, che si ritiene essere prodotta dalle cellule endoteliali, è stata trovata attorno ai vasi sanguigni nell'astrocitoma e la sua espressione correla con l'angiogenesi e con la progressione tumorale dal grado II al grado III.^{101,152} Tenascina-C è sovra-espressa nel glioma invasivo sia in vitro che in vivo,¹⁰⁴ confermando così la sua importanza come molecola ECM nella patologia del glioma.

Infine, le galectine sono up-regolate nel glioma e risultano coinvolte nella migrazione delle cellule di glioma e nell'angiogenesi. Mentre alti livelli di Gal-1 sono correlati con l'aggressività di molti tumori, l'espressione di Gal-3 da parte degli astrociti e delle cellule endoteliali può essere utilizzata in campo diagnostico per differenziare il GBM da altri tipi di gliomi meno maligni.¹⁰¹

La rappresentazione schematica del microambiente ECM/glioma e la sintesi delle molecole della matrice extracellulare maggiormente rappresentative e il loro significato funzionale sono mostrate in Figura 1.3 e in Tabella 1.3.

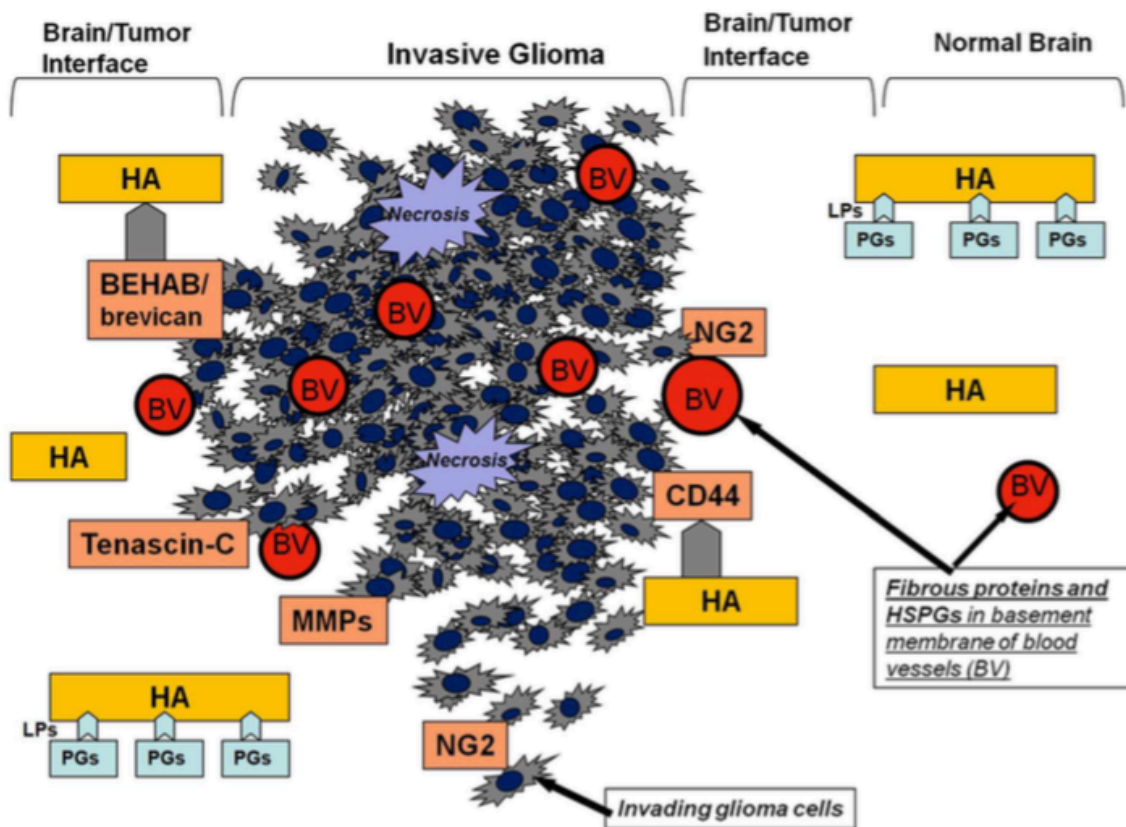


Fig. 1.3 Rappresentazione schematica del microambiente della matrice extracellulare (ECM) di glioma invasivo con centri necrotici e parenchima cerebrale associato.

L'acido ialuronico (HA), una lunga molecola "riempitrice di spazio" costituita da una catena di carboidrati è mostrata sia non legata sia legata ai proteoglicani (PG) tramite proteine di collegamento (*link proteins* - LP) oppure legato al recettore CD44. Sono anche mostrate due molecole ECM associate al glioma (entrambi condroitin solfato proteoglicani): la *brain enriched hyaluronic acid binding protein*/brevican (BEHAB / brevican) e la proteina neurogliale-2 (NG2), quest'ultima espressa dalle cellule di glioma e dai periciti dei vasi sanguigni. Inoltre sono mostrate la glicoproteina tenascina-C e le metalloproteasi della matrice (MMP).

I vasi sanguigni (BV), mostrati nel glioma e nel parenchima cerebrale associato, contengono proteine fibrose quali collagene, laminine, etc. ed eparan solfato proteoglicani (HSPG), associati con la membrana basale dei vasi sanguigni.

1. Gliomi cerebrali

Molecole	Sede		Funzione
	Encefalo	Glioma	
<p>Glicosaminoglicani (GAG):</p> <p>- Acido ialuronico (HA)</p> <p>- Proteoglicani (PG):</p> <p>· Condroitin solfato PG (CSPG):</p> <p>·· lecticani:</p> <p> aggrecan</p> <p> neurocan</p> <p> versican</p> <p> BEHAB/brevican</p> <p>·· NG2</p> <p>· <i>Link proteins</i> (LP)/HAPLN</p> <p>· Eparan solfato PG (HSPG) (glipicani, sindecani)</p>	<p>+</p> <p>+</p> <p>+</p> <p>+</p> <p>+</p> <p>+</p> <p>+</p> <p>+</p> <p>+</p>	<p>+++</p> <p>+++</p> <p>?</p> <p>++</p> <p>+++</p> <p>+++</p> <p>+++</p> <p>+</p> <p>+/-</p> <p>+</p> <p>++(sin-2)</p>	<p><u>HA</u>: molecola di riempimento, si lega ai recettori di superficie della cellula CD44 e RHAMM; regolazione della ECM; regola proliferazione, adesione e motilità cellulare.</p> <p><u>PG</u>: proteine leganti l'HA.</p> <p><u>CSPG</u>: livelli alti nel cervello del feto in via di sviluppo e nel glioma.</p> <p><u>Lecticani</u>: aggrecan (neuroni), neurocan (neuroni, glia), versican (glia), brevican (glia, neuroni); si legano all'HA e ai recettori di superficie della cellula, regolano la motilità cellulare e la navigazione assonale; incrementano la migrazione delle cellule di glioma; inibiscono la migrazione delle normali <i>stem cell</i> cerebrali.</p> <p><u>NG2</u>: espresso dal progenitore del sistema nervoso centrale, dai periciti, dalle cellule di glioma; si lega al collagene VI e al CD44.</p> <p><u>LP</u>: si legano all'HA e ai lecticani; stabilizzano il legame della proteina del <i>core</i> all'HA.</p> <p><u>HSPG</u>: si legano alla lamina basale dei vasi sanguigni e alle superfici ependimali, astrogliali e endoteliali; sito di accumulo per citochine e fattori di crescita.</p> <p><u>Tenascine</u>: espresse in zone di proliferazione, migrazione e morfogenesi; la Tenascina-C sovraespressa nel glioma.</p> <p><u>Galectine</u>: (glia e cellule endoteliali) proteine leganti i glicani; sviluppo di reti neuronali e non, angiogenesi.</p> <p><u>Proteine fibrose</u>: elementi strutturali del tessuto connettivo nella membrana basale dei vasi sanguigni nel cervello normale e nel glioma; in gliomi di alto grado, espresse anche dalle cellule di glioma.</p> <p><u>MMP</u>: tessuto, rimodellamento della ECM, angiogenesi; MMP-2, -9, -13 e MT1-MMP hanno un ruolo nella progressione del glioma.</p>
<p>Tenascine: C ed R (glicoproteine)</p>	+	+++	
<p>Galectine (lectine)</p>	+	+++	
<p>Proteine fibrose</p> <ul style="list-style-type: none"> • collageni • fibronectine • laminine • vitronectine 	<p>Solo nei vasi sanguigni</p>	<p>+</p> <p>+</p> <p>+</p> <p>+</p>	
<p>Metalloproteasi della matrice (MMP), proteasi</p>	+	+++	

Tabella 1.3 Molecole della matrice extracellulare e loro significato funzionale nell'encefalo sano e in presenza di glioma cerebrale

1.5.4 Metalloproteasi della matrice e loro inibitori nel glioma

1.5.4.1 Metalloproteasi nel glioma

L'infiltrazione locale di cellule neoplastiche all'interno del parenchima cerebrale sano è la caratteristica distintiva dei gliomi. Come ampiamente descritto in precedenza, è importante notare che la matrice extracellulare del cervello differisce in composizione da altre matrici di questo tipo e che le cellule del glioma hanno la capacità di sfruttare questo ambiente per l'invasione. Le cellule del glioma disseminano in modo aggressivo come singole cellule attraverso la peculiare ECM del sistema nervoso centrale. Si infiltrano lungo i vasi sanguigni periferici o lungo i tratti longitudinali della sostanza bianca utilizzando diversi enzimi proteolitici, raggiungendo in tal modo il duplice obiettivo di invadere e "metastatizzare". Serina, cisteina e metalloproteasi vengono impiegate per abbattere le barriere del tessuto connettivo, per indurre angiogenesi e penetrare il tessuto cerebrale normale, assumendo in tal modo il fenotipo invasivo,⁵⁴ vari studi hanno dimostrato una sovra-espressione di queste molecole nei gliomi.^{54,119}

Il sistema delle proteasi implicato nei gliomi maggiormente studiato è rappresentato dalle metalloproteasi della matrice (MMP – *Matrix Metalloproteinases*).

Le metalloproteasi sono una variegata famiglia di endopeptidasi che utilizzano lo zinco nel loro sito attivo e comprendono un ampio spettro di substrati. Caratteristiche strutturali comuni alle metalloproteasi includono un peptide segnale, un dominio catalitico che ospita il sito legante zinco e un dominio emopexina-simile.

Le metalloproteasi sono note per il loro coinvolgimento nel normale rimodellamento tissutale, per essere prodotte dalle cellule di glioma¹³² e per essere coinvolte nella modificazione della matrice extracellulare del glioma stesso. Il risultato della degradazione della matrice extracellulare da parte delle metalloproteasi è il rilascio e la diffusione di citochine e di fattori di crescita immagazzinati nella ECM, con conseguente ulteriore attivazione delle metalloproteasi da parte di questi fattori.¹⁰²

L'attività proteolitica delle metalloproteasi influenza molteplici funzioni cellulari quali la proliferazione, l'adesione, la migrazione, l'angiogenesi, lo sviluppo osseo e la guarigione delle ferite, e fra le altre, in virtù del clivaggio dei costituenti della matrice extracellulare, influenza fattori di crescita, recettori dei fattori di crescita e molecole di adesione. La up-regolazione delle metalloproteasi è tradizionalmente associata con infiammazione, patologie vascolari e progressione neoplastica. In particolare, all'interno del micro-ambiente tumorale, le metalloproteasi giocano un ruolo critico nella metastatizzazione e nell'angiogenesi, come è ben documentato.¹⁵³

Le metalloproteasi abbracciano un'ampia gamma di sottotipi e interagiscono con molteplici target.

La famiglia delle metalloproteasi umane racchiude oltre 23 membri ed è capace di scindere ogni componente della matrice extracellulare; fra quelle implicate nel glioma ricordiamo le collagenasi quali la MMP-1, le stromelisine quali la MMP-11, le metalloelastasi quali le MMP-12 e MMP-19, le *Membrane Type* (MT) -MMP e, soprattutto, le gelatinasi MMP-2 e MMP-9.

Le metalloproteasi sono prodotte nella cellula come zimogeni, dove la cisteina dal pro-dominio si lega allo zinco nel sito catalitico, e richiedono la scissione proteolitica per l'attivazione. L'attivazione delle metalloproteasi spesso richiede la scissione da parte di altre metalloproteasi o da serin-proteasi al di fuori della cellula. Alcune invece, incluse le *Membrane Type*-MMP (connesse covalentemente alla membrana cellulare o legate ad essa tramite integrine o CD44), sono attivate in sede intracellulare.¹⁵⁴ Oltre che dall'attivazione dei pro-enzimi, l'attività delle metalloproteasi è anche regolata dall'espressione genica, compartimentalizzazione e inibizione degli enzimi attivi da parte dei loro specifici inibitori tissutali (si veda sezione seguente).

L'analisi dell'espressione delle metalloproteasi in pazienti con cancro mostra una forte correlazione fra l'aumentata espressione di molte metalloproteasi e la progressione tumorale in un'ampia gamma di tumori maligni, compresi i gliomi. All'interno del tumore, le metalloproteasi sono secrete dalle cellule tumorali, così come dalle cellule stromali del tumore.⁵⁵ Sembra che le cellule tumorali producano un potente fattore denominato induttore della metalloproteasi della matrice extracellulare (EMMPRIN), una glicoproteina di superficie della superfamiglia delle immunoglobuline. L'EMMPRIN stimola l'espressione delle metalloproteasi nelle cellule stromali e anche nelle cellule tumorali.¹⁵⁵

Diversi studi hanno documentato una sovra-espressione delle metalloproteasi nei gliomi rispetto al tessuto cerebrale normale. Ad ogni modo, le metalloproteasi implicate nei gliomi sono risultate quasi esclusivamente le gelatinasi MMP-2 e MMP-9.⁵⁴

La vascolarizzazione del glioma così come l'infiltrazione di cellule infiammatorie, le quali formano parte della massa del glioma, sono state correlate all'espressione delle metalloproteasi.¹⁵⁶ Una forte espressione delle gelatinasi correla con il grado del tumore.^{157,158}

È stato dimostrato che la linea cellulare di glioblastoma multiforme più invasiva produce i più alti livelli di gelatinasi.^{159,160} Studi sulle gelatinasi in un gruppo di gliomi umani con diversi gradi di malignità hanno dimostrato un'espressione massima della MMP-2 nelle cellule tumorali, mentre l'espressione della MMP-9, sebbene osservata anche nelle cellule tumorali, è risultata maggiore nella vascolarizzazione.¹⁶¹ Altri studi hanno riportato livelli aumentati di MMP-9 nei vasi sanguigni ai margini della proliferazione.¹⁶² Studi in vitro hanno portato alla luce una correlazione fra l'espressione delle gelatinasi e l'invasione delle cellule di glioma.²⁹ È stato dimostrato come il knockdown del gene Akt2 porti a una diminuita espressione della MMP-9, con concomitante riduzione dell'invasione del glioma in vitro e in vivo.¹⁶³ È necessario sottolineare che i livelli di EMMPRIN sono più elevati nel glioma e correlano con il grado del tumore.¹⁶⁴ EMMPRIN inoltre aumenta l'acido ialuronico e si co-localizza con il suo recettore CD44,¹⁶⁵ potendo avere un ruolo significativo nell'invasione del glioma.

Oltre alle gelatinasi, diversi studi documentano il ruolo della MT1-MMP così come del coinvolgimento di altre metalloproteasi nei gliomi.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ La funzione più nota della MT1-MMP è l'attivazione della pro-MMP-2 in associazione con il TIMP-2 (Inibitore tissutale delle metalloproteasi della matrice di tipo 2).¹⁷⁰ È stato dimostrato che la MT1-MMP è aumentata nella microglia glioma-associata e che fattori rilasciati dal glioma inducono questa espressione da parte della microglia. La MT1-MMP attiva poi la pro-MMP-2 derivata dal glioma e promuove l'espansione del glioma stesso.¹⁷¹

È ben documentato il ruolo cardine che le gelatinasi MMP-2 e MMP-9, così come la proteasi di membrana MT1-MMP, giocano nell'invasione tumorale e nell'angiogenesi.¹⁷² MMP-2 e MMP-9 mostrano una correlazione positiva con l'invasione e l'angiogenesi del glioma.¹⁵⁸ I componenti della membrana basale vascolare sono ampiamente riconosciuti come substrati della MMP-2 e della MMP-9. MMP-9 è un componente noto dello *switch angiogenico* che regola la biodisponibilità del VEGF.¹⁷³ L'espressione della MMP-2 è stata correlata con il grado di vascolarizzazione dei noduli tumorali.¹⁷⁴ Altri studi supportano il ruolo della MT1-MMP nell'angiogenesi.¹⁷² Queste stesse metalloproteasi sono presenti sul fronte di invasione del tumore. Gli invadopodi sono protrusioni ricche di actina delle cellule tumorali con attività proteolitica. Le gelatinasi e la MT1-MMP si localizzano in corrispondenza degli invadopodi e qui vengono attivate.¹⁷⁵

Per quanto riguarda le altre metalloproteasi, Lettau et al. hanno scoperto che la MMP-19 è fortemente espressa nei tumori astrogliali ed è anche responsabile dell'invasione delle cellule di glioma in vitro.¹⁷⁶ Stojic et al. hanno mostrato un'accresciuta espressione di MMP-1, MMP-11 e MMP-19 nel glioblastoma multiforme rispetto ad astrocitomi di basso grado e al cervello normale.¹⁷⁷ La tenascina-C è una proteina della matrice extracellulare del parenchima cerebrale sano e la sua sintesi è nota essere up-regolata nel glioma. La MMP-12 è risultata implicata nell'invasione di linee cellulari di glioma utilizzando la tenascina-C in un modello di matrice tridimensionale.¹⁷⁸

Le metalloproteasi sembrano dunque avere un ruolo centrale nell'aggressività del glioma, si deve sottolineare però che, in virtù della loro capacità di degradazione, generano anche degli inibitori dell'angiogenesi endogena.

1.5.4.2 Inibitori tissutali delle metalloproteasi della matrice nel glioma

Come detto in precedenza, la regolazione delle metalloproteasi avviene a quattro livelli differenti: trascrizione, attivazione degli zimogeni, compartimentalizzazione e inibizione naturale endogena. Gli inibitori tissutali delle metalloproteasi della matrice (TIMP – *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases*) sono specifici inibitori endogeni delle metalloproteasi¹⁷⁹ e sono stati correlati, sia positivamente sia negativamente, con l'invasione del glioma.

Sebbene siano noti per la loro funzione primaria di inibitori delle metalloproteasi, è oggi ampiamente riconosciuto che i TIMP esibiscono ulteriori attività biologiche. Esistono quattro membri TIMP: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4; tutti inibiscono l'attività delle metalloproteasi. TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-4 sono secreti, mentre TIMP-3 è associato alla matrice extracellulare. Sono regolati in modo differente, ad esempio l'espressione di TIMP-1 è inducibile, mentre l'espressione di TIMP-2 è costitutiva.^{180,181}

Le attività dei TIMP indipendenti dalla loro funzione primaria di inibizione delle metalloproteasi includono la promozione della crescita cellulare (TIMP-1 e TIMP-2), l'apoptosi, l'angiogenesi, così come un ruolo nella comunicazione cellulare (*signaling*). Tali ruoli dei TIMP sono emersi quando la sovra-espressione di queste molecole ha portato risultati contrastanti. Diversi studi, in una prima fase, hanno mostrato un ruolo inibitorio dei TIMP nella crescita tumorale e nelle metastasi; numerosi studi, però, hanno anche dimostrato una loro funzione promotrice dei tumori e che i livelli di TIMP nel siero correlano con una prognosi negativa.⁵⁵

Questa paradossale duplice funzione promotrice e inibitoria dei tumori dei TIMP si estende ugualmente ai gliomi. Studi che dimostrano il classico ruolo dei TIMP mostrano, ad esempio, che l'aggiunta di TIMP-2 a cellule di glioblastoma in coltura ne riduce l'invasione¹⁵⁶ ed è stata anche osservata una diminuzione nei livelli di TIMP-2 nei glioblastomi.¹⁸² La sovra-espressione di TIMP-3 sopprime l'infiltrazione di cellule di glioma.¹⁸² È interessante come quello del TIMP-3 sia uno dei geni più metilati presenti nei tumori cerebrali ed è stato indicato come un onco-soppressore.¹⁸³

Alcuni autori hanno individuato livelli di TIMP-1, ma non di TIMP-2, significativamente più alti nel glioblastoma multiforme rispetto ad altri gradi di glioma,¹⁶⁹ e altri hanno dimostrato un incremento significativo dei livelli di TIMP-1 nei glioblastomi rispetto a tumori di basso grado.¹⁶⁸ Pagenstecher et al. hanno studiato i profili di espressione di nove metalloproteasi e di tutti i TIMP in diversi gliomi e hanno scoperto che l'espressione del TIMP-1 era più alta nei glioblastomi multiformi e nei gliomi di grado I; l'espressione era confinata alle pareti dei vasi neoformati.¹⁸⁴ Groft et al.¹⁸⁵ hanno condotto un ampio studio sull'espressione e la localizzazione di tutti e quattro i TIMP nel cervello umano normale e nei gliomi. Un'analisi dettagliata dell'espressione dell'RNA messaggero e dei livelli delle proteine ha svelato che i pattern di espressione di TIMP-2 e TIMP-3 non variano con il grado del tumore. D'altra parte, i livelli di TIMP-1 correlano positivamente con la malignità del glioma, mentre quelli del TIMP-4 correlano negativamente. L'espressione del trascritto del TIMP-1 si localizza nella cellula tumorale e nella vascolarizzazione circostante il tumore, mentre i trascritti del TIMP-4 si trovano principalmente nelle cellule tumorali, con minore espressione nei vasi. Perciò, seppure i TIMP abbiano dimostrato chiaramente di giocare un ruolo rilevante negli aspetti di crescita e invasione del glioma, i loro precisi ruoli sfuggono ancora.

MENINGIOMI CEREBRALI

I meningiomi sono tumori che originano dalle cellule aracnoidee delle leptomeningi (aracnoide e pia madre) che rivestono il cervello e il midollo spinale. Secondo i dati epidemiologici attuali, costituiscono i tumori intracranici più comuni, con un'incidenza di 7,7 per 100.000. I meningiomi sono tumori della popolazione anziana, con un netto aumento d'incidenza dopo i 65 anni.²⁸ Essi preferenzialmente colpiscono le donne, con un rapporto femmine:maschi di 3,5:1.¹⁸⁶ I meningiomi nei bambini sono eccezionalmente rari. Fattori di rischio diversi dall'età comprendono l'esposizione alle radiazioni ionizzanti,¹⁸⁷ la presenza di diabete mellito o ipertensione arteriosa, e, probabilmente, il fumo; l'uso di telefoni cellulari non sembra essere associato ad un aumentato rischio di tumore.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰

Circa il 90% dei meningiomi si sviluppa dalle meningi cerebrali, il 10% da quelle spinali.¹⁹¹

I sintomi clinici d'esordio riflettono la regione anatomica interessata e compressa dal meningioma o dall'edema peritumorale. In molti casi, i pazienti con meningiomi di piccole dimensioni sono asintomatici, e il tumore viene diagnosticato incidentalmente come conseguenza di accertamenti neuroradiologici eseguiti per altri scopi.¹⁹¹ Spesso infatti il tumore raggiunge dimensioni considerevoli prima di dare sintomi.

Alcuni pazienti possono presentare più meningiomi. Tra questi casi, circa l'1% delle presentazioni multiple è associata ad alterazioni del gene della neurofibromatosi di tipo 2, NF2, e il 4% di questi casi non sono invece correlati con NF2.¹⁹² I meningiomi ereditari negli adulti sono altamente associati ad alterazioni del gene NF2, e dal 50% al 75% dei pazienti con neurofibromatosi di tipo 2 sviluppano meningiomi durante il corso della loro vita.¹⁹³ Lo sviluppo di meningiomi in presenza di altre sindromi tumorali familiari è raro.

I meningiomi sono per la maggior parte tumori a lenta crescita considerati benigni (grado I sec. WHO). Tuttavia alcuni meningiomi, seppur di grado I, potrebbero recidivare. Meno del 20% dei casi sono classificati come di grado 2 sec. WHO (meningiomi atipici) o di grado 3 WHO (meningioma anaplastico/maligno), e questi presentano un comportamento clinico più aggressivo con un rischio più elevato di recidivare, con conseguente aumento della morbidità e mortalità associate.⁵⁷ Sebbene siano tumori a lenta crescita, durante la loro evoluzione tendono a comprimere strutture anatomiche critiche e possono portare ad significativo deterioramento delle funzioni neurologiche.

Pur non manifestando una modalità di crescita di tipo infiltrante come quella dei gliomi maligni, anche per i meningiomi lo sviluppo, la crescita e l'eventuale progressione maligna risentono e dipendono dal microambiente della matrice extracellulare circostante. Infatti, anche per questi tumori si assiste a un rimodellamento della matrice extracellulare che favorisce la crescita tumorale. Risultano espressi marker responsabili delle alterazioni della matrice extracellulare e dell'adesività. In particolare, la principale caratteristica di questi tumori è la capacità delle cellule di meningioma di elaborare esse stesse proteine della matrice extracellulare.⁴⁵

2.1 Caratteristiche patologiche

I meningiomi originano dalle cellule del cappuccio (*cap cells*) aracnoideo, che formano lo strato esterno della membrana aracnoidea e i villi aracnoidei (o granulazioni di Pacchioni).¹⁹¹

Queste cellule rappresentano un sottogruppo di cellule aracnoidee morfologicamente distinto e con elevata attività metabolica, coinvolto nel riassorbimento del liquido cefalo-rachidiano.¹⁹⁴ Le cellule del cappuccio aracnoideo sono situate all'apice delle granulazioni di Pacchioni e sono esposte al flusso vascolare venoso, spesso all'interno del seno durale.¹⁹⁴ Le granulazioni sono responsabili del drenaggio del liquido cerebrospinale (CSF) nei seni durali e nelle vene.

Le cellule del cappuccio aracnoideo possono apparire sia come un singolo strato di cellule fibroblasto-simili, sia come nidi epitelioidi che formano diversi strati.¹⁹¹ Embriologicamente,

2. Meningiomi cerebrali

le meningi del basicranio derivano dal mesoderma, mentre le meningi telencefaliche derivano dalla cresta neurale.¹⁹⁵ Con l'età, gruppi di cellule del cappuccio diventano sempre più prominenti, formando vortici e corpi psammomatosi identici a quelle che si trovano nei meningiomi. Sulla base di analogie citologiche e funzionali con le cellule di meningioma, le cellule del cappuccio aracnoideo sono favorite come le cellule di origine più probabili.¹⁹⁶

Quale controparte neoplastica delle cellule del cappuccio aracnoideo, i meningiomi possono presentare sia caratteristiche mesenchimali, sia epiteliali, da cui l'aspetto istopatologico dei sottotipi più frequenti di meningioma (Tabella 2.1). Circa l'80% dei meningiomi sono di grado 1 secondo la classificazione della *World Health Organization* (WHO), e consistono principalmente in tumori di tipo meningoteliale, fibroso, o misto (transizionale). Alcuni sottotipi istopatologici di meningiomi si associano a specifiche localizzazioni anatomiche intracraniche. I meningiomi meningoteliali (epiteliali) si trovano frequentemente nel basicranio, mentre i meningiomi fibroblastici hanno maggiori probabilità di svilupparsi in corrispondenza della convessità encefalica.^{197,198}

Sottotipo Istologico	Grado WHO
Meningioma Meningoteliale	1
Meningioma Fibroblastico	1
Meningioma Transizionale (Misto)	1
Meningioma Psammomatoso	1
Meningioma Angiomatoso	1
Meningioma Microcistico	1
Meningioma Secretorio	1
Meningioma ricco in Linfoplasmacellule	1
Meningioma Metaplastico	1
Meningioma Cordoide	2
Meningioma a Cellule Chiare	2
Meningioma Atipico	2
Meningioma Invasivo Cerebrale	2
Meningioma Papillare	3
Meningioma Rabdoide	3
Meningioma Anaplastico	3

Tabella 2.1 Sottotipi istologici di meningioma e grading secondo WHO

Circa il 20% dei meningiomi rientrano nel gruppo dei tumori atipici di grado 2 secondo WHO.¹⁹¹ I meningiomi atipici sono caratterizzati da caratteristiche istologiche aggressive, come l'aumento dell'attività mitotica, atipie nucleari, e necrosi. La biologia aggressiva si riflette sul fatto che i pazienti con meningiomi di grado 2 hanno vissuto un rischio di recidiva di circa otto volte aumentato rispetto ai pazienti con meningiomi benigni di grado 1, e sul notevole aumento del rischio di mortalità associata a meningiomi di grado 2 rispetto al grado 1 in controlli di pari età e sesso. I meningiomi con comprovata invasione cerebrale sono anch'essi considerati di grado 2, e i pazienti con questi tumori sono inclini ad un aumento del rischio di recidiva. Tuttavia, i meccanismi molecolari che guidano l'invasione cerebrale non sono stati finora ben compresi. I meningiomi maligni di grado 3 secondo WHO sono rari, rappresentando solo dall'1% al 2% di tutti i meningiomi, ma sono associati con un considerevole rischio di morte e una sopravvivenza media di meno di 2 anni.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Mentre nei meningiomi atipici è possibile individuare almeno focalmente le caratteristiche istopatologiche tipiche del meningioma, nei meningiomi maligni di grado 3 può mancare

completamente un qualsiasi accenno morfologico che indirizzi verso una origine meningeo della neoplasia, richiedendo così approfondite indagini patologiche per confermare la vera natura del tumore.¹⁹¹

La classificazione istologica del tumore (*Grading WHO*) è uno dei fattori più forti in grado di influenzare la recidiva del tumore e la prognosi generale.²⁰¹

I meningiomi possono presentarsi con un ampio spettro di modelli istopatologici, ed è anche possibile riscontrare la coesistenza di varie caratteristiche morfologiche entro uno stesso tumore. Utilizzando l'immunoistochimica per la diagnosi differenziale, è bene ricordare che di solito i meningiomi esprimono sempre l'antigene epiteliale di membrana (EMA) e la vimentina. La citocheratina solitamente non è espressa e questo aiuta nella diagnosi differenziale con i carcinomi metastatici.¹⁹⁶

2.1.1 Anomalie genetiche e biologia molecolare nei meningiomi

La prima alterazione genetica descritta è stata la perdita del cromosoma 22, e le alterazioni del cromosoma 22 sono ancora i ritrovamenti più frequenti nei meningiomi. Successivamente, è stato identificato un gene sul cromosoma 22 responsabile della sindrome tumorale ereditaria neurofibromatosi di tipo 2 (NF2).^{202,203} Sebbene lo schwannoma vestibolare bilaterale sia il segno distintivo della malattia, la maggior parte dei pazienti affetti da NF2 sviluppano molteplici meningiomi, il che suggerisce un ruolo del gene NF2 nello sviluppo dei meningiomi.²⁰⁴ Infatti, le perdite alleliche del cromosoma 22, compresa la regione NF2, si verificano in più del 50% dei meningiomi sporadici.²⁰⁵⁻²⁰⁸ Nei meningiomi con perdite alleliche (perdita di eterozigosi [LOH]) al locus NF2, possono essere trovate mutazioni puntiformi nel restante allele nei meningiomi sporadici, il che suggerisce una completa inattivazione del gene.^{209,210} Merlin, il prodotto del gene NF2, ha una significativa omologia di sequenza con i membri della famiglia di proteine *ezrin/radixin/moesin* (ERM), che collegano diversi recettori di adesione cellulare al citoscheletro di actina corticale.²¹¹ La frequenza di inattivazione di NF2 è approssimativamente uguale tra i diversi gradi WHO, il che suggerisce che la perdita di NF2 sia un'alterazione iniziante piuttosto che di progressione tumorale.^{200,212-214}

In base alla variante istologia, sono state segnalate differenze nella frequenza di alterazioni del gene NF2. Le varianti fibroblastica, di transizione, e psammomatosa manifestano frequenze più elevate di alterazioni di NF2 rispetto alla variante meningoteliale o a quella secretoria.^{212,215-217} Di conseguenza, i pazienti che non presentano una meningiomatosi multipla familiare NF2 hanno più probabilità di sviluppare un meningioma di tipo meningoteliale.²¹⁸

È stata riportata anche un'associazione tra il gene NF2 e la sede del tumore. I meningiomi di convessità si associano con maggiore frequenza ad alterazioni NF2 rispetto ai tumori del basicranio anteriore.¹⁹⁷

I pazienti con neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) solo raramente presentano meningiomi,²¹⁹ e mutazioni del gene NF1 sono assenti nei meningiomi anaplastici, il che suggerisce che le alterazioni NF1 non sono coinvolte nello sviluppo del meningioma e/o nella sua progressione.²¹⁴

Sulla base del recente sequenziamento dell'intero genoma, poche altre alterazioni genetiche ricorrenti sono state identificate nei meningiomi benigni. A tal proposito possiamo ricordare l'identificazione nel 2013 di quattro geni alterati in una piccola frazione di meningiomi: TRAF7, Klf4, AKT1, e SMO.^{213,220,221}

La proteina merlin appartiene alla famiglia delle proteine 4.1, insieme a membri che collegano la proteina di membrana al citoscheletro. Un gene della famiglia di proteine 4.1 rilevante per la biologia del meningioma è DAL1. Una ridotta espressione della proteina 4.1B prodotta del gene DAL1, è stata trovata in circa il 60% dei meningiomi indipendentemente dal grado istologico, il che suggerisce che la perdita della proteina 4.1B è un altro evento precoce nella patogenesi del meningioma.^{222,223} Quasi tutti i tumori con DAL1 LOH hanno

2. Meningiomi cerebrali

simultaneamente NF2 LOH.²²⁴ Le alterazioni DAL1 sembrerebbero essere associate alle prime fasi della progressione neoplastica.

Infine quasi tutti i recettori per fattori di crescita noti per essere coinvolti nella crescita tumorale, quali il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR), il recettore per il fattore di crescita derivato dalle piastine (PDGFR) beta, il recettore per il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGFR), il recettore per il fattore di crescita insulino-simile (IGFR), risultano espressi nei meningiomi.²²⁵⁻²²⁸

2.1.1.1 Progressione maligna nel meningioma

Generalmente si ritiene che i meningiomi passino da basso grado ad alto grado di malignità. Istologicamente, la progressione dal grado 1 al grado 2 può essere confermata nel 17% al 38% dei casi e dal grado 1/2 al grado 3 nel 54% al 70%.^{229,230} A livello citogenetico, è stata dimostrata una acquisizione graduale di guadagni e perdite cromosomiche durante la progressione del meningioma.

Le perdite di 1p, 6q, 10q, 14q e 18q, così come i guadagni di 1q, 9q, 12q, 15q, 17q e 20q sono stati proposti come eventi importanti nella progressione e nella recidiva di meningioma,^{213,231-235} e la perdita di 1p e 14q soprattutto sono associate con la progressione del meningioma.²³⁶⁻²³⁸

Perdite di 6q, 9p, 13, e 14 si trovano esclusivamente in meningiomi altamente proliferanti.²³⁹ I meningiomi aggressivi indotti dalle radiazioni mostrano aberrazioni citogenetiche sui cromosomi 1p, 6q e 22.²⁴⁰

Sono stati identificati pochi geni specifici associati con le alterazioni cromosomiche. Oltre ad NF2, il gene dell'inibitore tissutale della metalloproteasi 3 (TIMP3), localizzato su 22q12, è un altro gene associato alla progressione del meningioma. L'ipermetilazione del promotore di TIMP3 avviene nel 17% dei meningiomi benigni, nel 22% degli atipici, e nel 67% degli anaplastici ed è associata alla perdita allelica su 22q12.²⁴¹ La proteina TIMP3 inibisce le metalloproteasi della matrice extracellulare, il che suggerisce che l'inattivazione genetica di TIMP3 per mezzo della ipermetilazione del promotore potrebbe favorire la crescita di un tumore aggressivo invasivo. TIMP3 possiede anche attività di onco-soppressore, e in vitro la sovra-espressione di TIMP3 riduce la crescita del tumore e induce apoptosi.²⁴² Tuttavia, l'ipermetilazione di TIMP3 non sembra associata con recidiva di tumore o sopravvivenza globale.²⁴³

Alterazioni su 9p21 sono state correlate con le perdite dei geni oncosoppressori CDKN2A (p16INK4a), p14ARF, e CDKN2B (p15INK4b).^{214,244} Nei meningiomi anaplastici di grado 3, delezioni di CDKN2A/CDKN2B sono associate ad una minor sopravvivenza.²⁴⁵

La regione 14q32 è stata implicata nella progressione del meningioma a causa del gene 3 maternamente espresso (MEG3), dotato di attività antiproliferativa nei meningiomi. Meningiomi aggressivi mostrano perdite alleliche, ipermetilazione del promotore, e ridotta espressione di MEG3 rispetto alle normali cellule aracnoidee.^{246,247} L'importante ruolo della perdita del cromosoma 14q è stato sostenuto da risultati che hanno mostrato NDRG2 come un gene comunemente inattivato nella progressione del meningioma. NDRG2 è sottoregolato nei meningiomi anaplastici e in un piccolo sottoinsieme di meningiomi di grado inferiore e nei meningiomi atipici con comportamento clinico aggressivo. La ridotta espressione di NDRG2 è associata con l'ipermetilazione del promotore.^{248,249}

2.2 Considerazioni chirurgiche

Usualmente il trattamento iniziale è l'asportazione chirurgica del meningioma e della sua base d'impianto durale, in particolare per i meningiomi di convessità, localizzati sulla superficie cerebrale esterna e pertanto facilmente accessibili chirurgicamente. Per indicare l'estensione dell'asportazione chirurgica si fa solitamente riferimento alla Classificazione di Simpson.²⁵⁰ L'estensione della resezione chirurgica correla con il rischio di recidiva e di sopravvivenza libera da progressione di malattia.²⁵¹ Dopo una asportazione macroscopicamente totale di un

meningioma di I grado (cioè del tumore e della dura d'impianto, Simpson grado I), il rischio di recidive tumorali è del 5%, 10% e 30% a 5, 10 e 15 anni, rispettivamente.²⁵⁰

Purtroppo non tutti i meningiomi possono essere asportati totalmente senza rischio di deficit neurologici post-operatori. In particolare l'asportazione chirurgica dei meningiomi del basiscranio può risultare complessa e non scevra da rischi, ad esempio per i nervi cranici,^{252,253} inoltre, in queste sedi, può risultare molto difficile, spesso impraticabile l'asportazione della dura d'impianto. Alcuni meningiomi localizzati in specifiche aree anatomiche, soprattutto se voluminosi, risultano particolarmente complessi da aggredire chirurgicamente. Tuttavia, tralasciando le difficoltà tecniche associate alla chirurgia di alcuni tipi di meningiomi, non oggetto di questa trattazione, i meningiomi rimangono pur sempre dei tumori benigni per i quali solitamente è ben identificabile un piano di clivaggio tumore-parenchima cerebrale sano. A differenza dei gliomi che si accrescono infiltrando e invadendo il parenchima cerebrale contiguo, i meningiomi crescono per espansione, portando alla compressione delle strutture cerebrali adiacenti, senza invaderle (fatta eccezione per i meningiomi di alto grado) e mantenendosi sempre come una massa distinta e ben distinguibile dal parenchima sano circostante, dal quale solitamente risultano divisi da un sottile strato aracnoideo. D'altro canto alcuni meningiomi, a differenza dei gliomi, mostrano una tendenza ad infiltrare la dura madre e l'osso.⁴⁷⁻⁴⁹

2.3 Matrice extracellulare nel meningioma

Laddove studi sul potenziale invasivo dei gliomi in relazione alle alterazioni della matrice extracellulare e all'espressione di proteine della matrice siano ben documentati,^{42,43} non altrettanto si può dire per i meningiomi, per i quali sono riportati limitati studi di questo genere in letteratura.⁴⁴

La principale funzione di derivazione mesenchimale delle cellule di meningioma è la loro capacità di elaborare proteine della matrice extracellulare.⁴⁵ Infatti, a causa del contributo del mesenchima nello sviluppo delle meningi,²⁵⁴ queste cellule possiedono alcune proprietà mesenchimali: analogamente ai fibroblasti sono in grado di sintetizzare e secernere molecole di procollagene e di produrre tessuto connettivo fibroso.⁴⁶ Ciò non deve stupire considerando che le cellule aracnoidee normali sintetizzano molte delle glicoproteine associate sia con la formazione delle membrane basali, sia con l'adesione delle cellule alla membrana basale (fibronectina, laminina, collagene IV, procollagene).²⁵⁵

La fibronectina è risultata essere espressa nella matrice extracellulare dei meningiomi nel 98-100% dei casi,^{45,256} comprese le pareti vasali, le formazioni vorticosi e i corpi psammomatosi.²⁵⁷ La sua presenza suggerisce che le cellule tumorali la producano.²⁵⁸ Alcuni studi dimostrano come sia maggiormente espressa nei corpi psammomatosi e nei vortici piuttosto che nelle pareti vasali.⁴⁶

La vitronectina è risultata maggiormente espressa nei meningiomi maligni.²⁵⁹

Abbiamo visto come le metalloproteasi, enzimi proteolitici zinco-dipendenti che degradano la matrice extracellulare, svolgano un ruolo nel rimodellamento di molti tessuti fisiologici e patologici,²⁶⁰ sono infatti implicate nella invasione ed angiogenesi dei gliomi¹⁶¹ e delle neoplasie sistemiche. Sono state identificate cellule stromali ma non tumorali che sovra-esprimono e secernono queste proteasi.²⁶¹⁻²⁶³ In particolare due membri della famiglia delle MMP, MMP-2 e MMP-9 anche note come collagenasi di tipo IV, giocano un ruolo critico nella invasione e metastatizzazione delle cellule tumorali.²⁶⁴ Studi dimostrano la presenza di elevati livelli di MMP-2 e MMP-9 nei meningiomi e nelle recidive di meningioma.⁴⁶ Sebbene risulti difficile determinare quale delle varie proteasi della matrice extracellulare sia responsabile dell'invasione cellulare nei tumori umani, le metalloproteasi potrebbero svolgere un ruolo significativo nella degradazione della matrice extracellulare associata all'invasione dei tumori cerebrali,⁴⁶ tanto più che nelle meningi normali non è osservabile l'espressione della MMP-9.²⁶⁵ Inoltre studi su campioni associati a recidive mostrano un maggior livello di espressione delle metalloproteasi.⁴⁶

2. Meningiomi cerebrali

Per quanto concerne gli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP) che regolano l'attività di queste proteasi,²⁶⁰ è stato riscontrato un basso livello di TIMP-1 nei meningiomi che successivamente hanno recidivato rispetto ai campioni neoplastici rappresentati essi stessi da recidive.⁴⁶ Studi su meningiomi invasivi hanno dimostrato che essi producono livelli significativamente inferiori di TIMP-1 rispetto ai meningiomi non invasivi.⁵⁰

Relativamente alle caratteristiche viscoelastiche di adesione i meningiomi hanno dimostrato di sovra-esprimere molecole implicate nei meccanismi di adesione cellulare (galectina-3),⁴⁶ sia cellula-cellula sia cellula-substrato,²⁶⁶ soprattutto nei meningiomi recidivi o nei campioni di pazienti che hanno successivamente sviluppato una recidiva neoplastica.^{46,267} La maggiore adesività delle cellule neoplastiche conferisce loro capacità di diffusione, rendendole in grado di aderire meglio alle cellule endoteliali attivate e alla matrice extracellulare. Tali cellule mostrano una maggiore sopravvivenza e resistenza all'apoptosi.⁴⁶

Il CD44, oltre a costituire il principale recettore per l'acido ialuronico, componente prevalente della matrice extracellulare cerebrale, facilita l'adesione ad un'ampia gamma di molecole della matrice,²⁶⁸ venendo considerato a tutti gli effetti una molecola di adesione cellulare con un possibile ruolo nella progressione neoplastica.²⁶⁹ In particolare media l'attaccamento cellulare alle componenti della matrice extracellulare, compresi collagene e fibronectina. Studi dimostrano che i meningiomi meningoteliali (Grado I WHO) mostrano la più bassa espressione di CD44 rispetto alle altre linee cellulari di meningiomi esaminate (Gradi II e III sec WHO),²⁷⁰ il CD44, inoltre, è risultato espresso in elevati livelli nei meningiomi di alto grado.²⁶⁹ I dati emersi suggeriscono una correlazione fra il potenziale invasivo del meningioma e l'espressione di una molecola implicata nei meccanismi di adesione cellulare. L'espressione del CD44 in una serie di meningiomi è risultata leggermente inferiore a quella riscontrata nei gliomi,²⁷¹ sottolineando ancora una volta il ruolo delle molecole di adesione cellulare nella biologia dei tumori, in particolare la loro correlazione con il potenziale invasivo e metastatico della neoplasia.

Le integrine sono glicoproteine integrali di membrana che fungono non solo da recettori della matrice, ma integrano e sostengono l'attività di adesione cellula-cellula necessaria per mantenere le cellule insieme nella costituzione della trama tissutale.

Alcuni autori suggeriscono che le cellule tumorali del meningioma sono in grado di modificare il proprio pattern di espressione delle integrine procedendo nella progressione neoplastica. In particolare, le subunità $\alpha 2$ e $\alpha 6$ delle integrine VLA (*Very Late Antigen*) sono espresse principalmente dai meningiomi maligni (Grado III WHO).²⁶⁹

In generale, il livello di espressione di tutti i marker responsabili delle alterazioni della matrice extracellulare e dell'adesività esaminati in letteratura tende ad essere maggiore nei meningiomi atipici rispetto alla controparte benigna.⁴⁶

BIOMECCANICA E MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA

3.1 Meccanica della cellula e modulo elastico di Young

Il campo della meccanica della cellula studia la relazione tra le forze e la deformazione quando queste sono applicate alle cellule. Tali forze possono essere parallele, come nel caso delle forze indotte dal flusso sanguigno, o perpendicolari, come nel caso di forze compressive o di trazione provocate dall'ambiente circostante la cellula (Fig. 3.1).³⁰

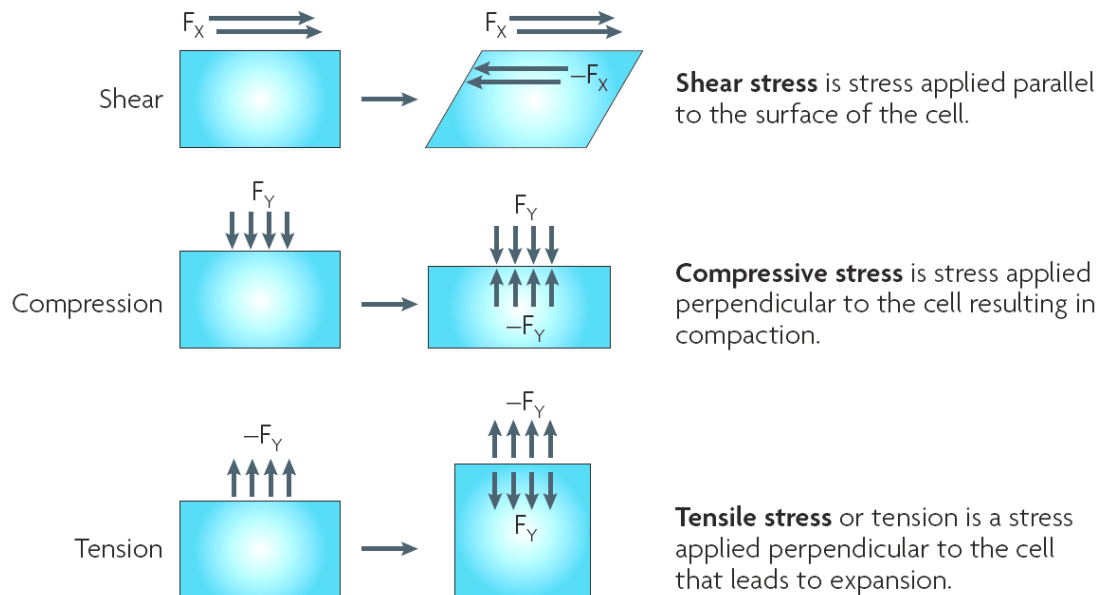


Fig. 3.1 Rappresentazione schematica delle forze cui è soggetta una cellula nell'organismo. A sinistra sono rappresentate le forze cui sono sottoposte le cellule durante i normali processi fisiologici; dall'alto verso il basso: forza di taglio, compressione e tensione. In accordo con la terza legge di Newton le cellule rispondono meccanicamente alle forze applicate fino a raggiungere un equilibrio, osservabile nella deformazione finale raggiunta dalla cellula (colonna centrale).³⁰

Una misura meccanica della cellula riflette le sue proprietà di rigidità e viscoelasticità. Il comportamento meccanico della cellula è influenzato da tre componenti: la membrana citoplasmatica, il nucleo e il citoscheletro (Fig. 3.2 e Fig. 3.3).

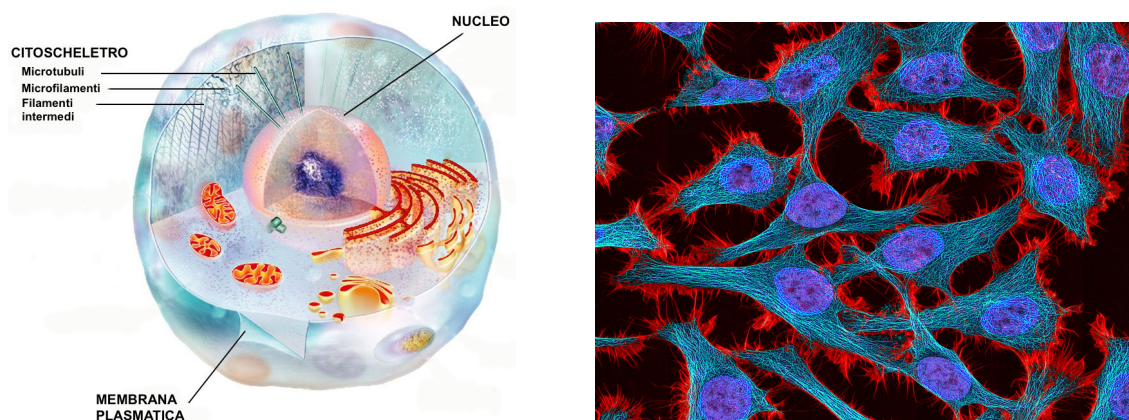


Fig. 3.2 (a sinistra) Principali strutture che governano il comportamento meccanico della cellula: membrana plasmatica, nucleo e filamenti del citoscheletro costituiti da microtubuli, filamenti intermedi e microfilamenti di actina.

Fig. 3.3 (a destra) Immagine di microscopia a fluorescenza multifotonica di cellule HeLa colorate con la tossina legante l'actina *phalloidin* per mettere in evidenza i microfilamenti (rosso), microtubuli (ciano), nuclei cellulari (blu). *National Center for Microscopy and Imaging Research*.

Il contributo del nucleo è significativo se la tecnica utilizzata tiene conto del comportamento globale della cellula piuttosto che del comportamento locale della membrana. Il nucleo è fisicamente collegato al citoscheletro, e attraverso di esso partecipa alle perturbazioni meccaniche applicate sulla membrana. Come conseguenza di forze meccaniche esterne il nucleo può variare il suo volume, provocando un cambiamento nel grado di condensazione del DNA e quindi influenzando l'attività di trascrizione genica.²⁷²

La membrana citoplasmatica è un doppio strato lipidico che oltre a provvedere agli scambi tra la cellula e l'ambiente circostante, media le alterazioni meccaniche cui la cellula è sottoposta. Il citoscheletro cellulare è costituito da filamenti proteici e rappresenta il principale responsabile del comportamento viscoelastico della cellula.

Il modo più semplice per misurare le proprietà meccaniche di una cellula è quello di misurare la sua rigidità (*stiffness*), che può essere quantificata ottenendo il rapporto tra stress cellulare e deformazione; ciò si traduce in una misura di modulo di Young.

Il Modulo di Young, o semplicemente Modulo Elastico, (E) è definito, in caso di carico uniassiale, come il rapporto tra lo sforzo applicato σ e la deformazione ϵ che ne deriva, si misura in Pa.

$$E = \frac{\sigma_{xx}}{\epsilon_{xx}} \quad [1]$$

Dove σ_{xx} è definito come il rapporto tra la forza applicata alla superficie e l'area della superficie, mentre la deformazione ϵ_{xx} come il rapporto tra la variazione in lunghezza provocata dalla forza e la lunghezza originale.

$$\sigma_{xx} = \frac{F_x}{A}, \epsilon_{xx} = \frac{\Delta L}{L} \quad [2]$$

Il valore del modulo di Young è maggiore per materiali più rigidi.

Misure di modulo di Young (E) di cellule mostrano come esse siano molto morbide, con valori compresi nel intervallo 0.1 – 40 *kPa* rispetto ad altri tipi di materiali polimerici artificiali, quali ad esempio la plastica, che hanno modulo di Young compreso tra $10^3 - 10^4$ *kPa* (Tabella 3.1).²⁷³ La Microscopia a Forza Atomica è una fra le principali tecniche utilizzate per stimare il modulo di Young. Oltre ad essa ricordiamo le altre principali metodiche che non saranno oggetto di questa trattazione e per le quali si rimanda a lavori specialistici⁹: trappole ottiche, aspirazione con micropipetta, citometria magnetica a torsione, microscopia a trazione e tecniche in regime di flusso laminare.

<i>Tipo di cellule</i>	<i>E (kPa)</i>	<i>Metodo</i>
Fibroblasto	0.6 – 1.6	AFM
Epiteliale normale	10 - 13	AFM
Epiteliale cancerosa	0.4 – 1.4	AFM
Neutrofilo passivo/attivo	0.35 / 0.8	AFM
Endoteliale	1.5 – 5.6	AFM
Osteoblasto	1 – 2	AFM
Miocita cardiaco	35 - 42	AFM

Tabella 3.1 Valori di modulo di Young per singole cellule, in coltura, ottenuti mediante misurazioni AFM.²⁷³

Un'altra grandezza biomeccanica fondamentale per la caratterizzazione dei materiali e dei sistemi biologici è il coefficiente di Poisson, definito come il rapporto tra la deformazione lungo l'asse di carico e nel piano perpendicolare ad esso.

$$\nu = - \frac{\varepsilon_{xx}}{\varepsilon_{yy}} \quad [3]$$

3.2 Modelli meccanici della cellula

La cellula rappresenta l'unità morfofunzionale degli organismi viventi ed è un oggetto estremamente difficile da modellizzare in quanto al suo interno, immersi nel citoplasma, ci sono numerosi organelli, moltissime proteine e macromolecole. L'ambiente interno di una cellula è perciò estremamente 'affollato'.²⁷⁴ Tuttavia esistono differenti modelli per descrivere la risposta meccanica delle cellule. Di seguito vengono descritti i modelli principali: il modello viscoelastico, il modello di poroelasticità e il *tensegrity model*.

Modello Viscoelastico

Questo modello è alla base degli studi sulla meccanica della cellula e consiste nel modellizzare la cellula mediante l'utilizzo di termini puramente elastici (molle) e puramente viscosi (*dashpots*) posti in serie e in parallelo. La risposta dei termini puramente elastici è caratterizzata dall'equazione 4 che mette in relazione la deformazione (ε) causata dall'applicazione di una sollecitazione meccanica (σ) con il modulo di Young del materiale (E):

$$\sigma = \varepsilon E \quad [4]$$

La risposta meccanica dei termini viscosi è descritta dall'equazione 5 che mette in relazione la variazione di deformazione del materiale nel tempo ($d\varepsilon/dt$), la sollecitazione meccanica cui è sottoposto (σ) ed il suo coefficiente di viscosità η ,

$$\sigma = \eta \frac{d\varepsilon}{dt} \quad [5]$$

Fanno parte dei modelli di viscoelasticità il modello di Maxwell, il modello di Kelvin-Voigt e lo *standard linear solid model* (SLS), riassunti in Tabella 3.2.

L'obiettivo dei modelli è di riprodurre le proprietà di un materiale viscoelastico, tra cui il rilassamento, vale a dire se la deformazione del materiale è mantenuta costante la sollecitazione meccanica diminuisce, e il fenomeno di *creep*, ossia se la sollecitazione meccanica è mantenuta costante la deformazione aumenta nel tempo.

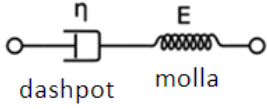
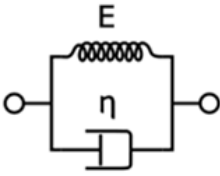
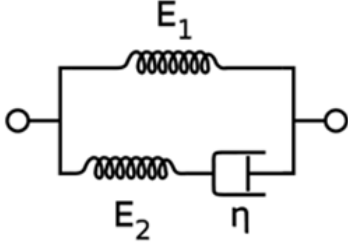
Modello di Maxwell	Modello di Kelvin-Voigt	SLS
		
Questo modello riproduce il fenomeno del rilassamento ma non tiene conto del fenomeno di <i>creep</i> .	Questo modello riproduce il fenomeno di <i>creep</i> ma non il rilassamento della sollecitazione meccanica.	Questo modello è una combinazione lineare dei precedenti, e ben riproduce il comportamento viscoelastico dei materiali

Tabella 3.2 Descrizione dei modelli di viscoelasticità

Modello di poroelasticità

Questo modello tratta la cellula come un materiale bifasico, considerando il citoscheletro come una salda rete elastica, immersa in un fluido viscoso, il citosol. Quando la cellula è deformata localmente, la fase elastica si modifica creando un aumento di pressione locale del fluido, che di conseguenza subisce una perturbazione. Il fluido per effetto della perturbazione tenderà a fluire radialmente, partendo dal sito della deformazione, fino ad arrivare ad una situazione di equilibrio. Tale modello è stato utilizzato per descrivere la formazione di protrusioni nella membrana cellulare.²⁷⁵

Tensegrity model

Nasce come modello ingegneristico per descrivere strutture tridimensionali costituite da reti di pilastri in compressione e cavi in tensione e viene proposto per descrivere la struttura cellulare²⁷⁶ considerando i filamenti intermedi e i filamenti di actina come i cavi in tensione, e i microtubuli come i pilastri in compressione.²⁷⁷ Il concetto che la cellula sia una struttura in tensione e compressione è oggi largamente accettato, anche se questo modello non ne descrive il comportamento viscoelastico.

3.3 Proprietà meccaniche dei tessuti

Un tessuto è un insieme di cellule, strutturalmente simili, associate per funzione. Un tessuto, oltre che dalle cellule specifiche che lo caratterizzano, è composto da matrice extracellulare, proteine ed altre macromolecole. Ogni tessuto è, inoltre, caratterizzato da specifiche proprietà meccaniche quali elasticità, viscosità, viscoelasticità e rigidità.²⁷⁸ Queste proprietà fisiche definiscono le caratteristiche del tessuto e come esso risponde ai segnali meccanici. Le forze meccaniche sono fondamentali nel normale sviluppo dei tessuti, ad esempio il principale stimolo per la crescita dei polmoni nel feto è proprio la tensione indotta dal respiro.²⁷⁹ Già durante lo sviluppo embrionale, i normali movimenti morfogenici generano sollecitazioni

compressive che influenzano la forma fisica dell'embrione.²⁸⁰ Un equilibrio tra le forze meccaniche è necessario per mantenere l'omeostasi del tessuto, l'assenza di tale equilibrio e la conseguente 'rottura' della struttura tissutale porta a diverse malattie. La tumorigenesi e la progressione delle neoplasie sono associate ad una progressiva perdita dell'omeostasi biomeccanica.²⁷ I metodi inizialmente utilizzati per studiare la meccanica della cellula, sono stati poi usati per misure meccaniche dei tessuti, ad esempio tecniche di tensione,²⁸¹ compressione,²⁸² misure di indentazione²⁸³ ed infine misure tramite AFM.^{17,22} Questi, e molti altri studi, hanno mostrato come la risposta meccanica sia governata dalle cellule individuali e dalla matrice extra cellulare.

3.3.1 Il ruolo della matrice extracellulare

Una parte sostanziale del volume di molti tessuti è rappresentata dallo spazio extracellulare, composto da una complessa rete di macromolecole denominata matrice extracellulare (ECM) la quale rappresenta un'impalcatura per il tessuto stesso e partecipa attivamente a funzioni regolative della cellula, influenzandone lo sviluppo, la proliferazione, la funzione e la sopravvivenza.²⁸⁴

Le macromolecole che compongono la matrice extracellulare sono: proteoglicani e glicosaminoglicani, proteine fibrose quali collagene, fibronectina, elastina e laminina (Fig. 3.4).²⁸⁵

I proteoglicani in un tessuto connettivo formano un gel altamente idratato in cui sono incorporate le proteine fibrose.²⁸⁶ Il gel di proteoglicani fornisce alla ECM la resistenza alle forze compressive e permette una rapida diffusione di nutrienti, metaboliti e ormoni necessari alle cellule. La fibronectina solubile va incontro a polimerizzazione in fibrille nella ECM attraverso un processo cellulo-mediato che richiede interazioni coordinate fra le integrine transmembrana e i microfilamenti di actina del citoscheletro (Fig. 3.4). Le fibre di collagene, insieme alla fibronectina, rappresentano i cavi in tensione che contribuiscono a mantenere l'organizzazione del tessuto. L'elastina è invece la proteina che dona al tessuto caratteristiche di elasticità e flessibilità.

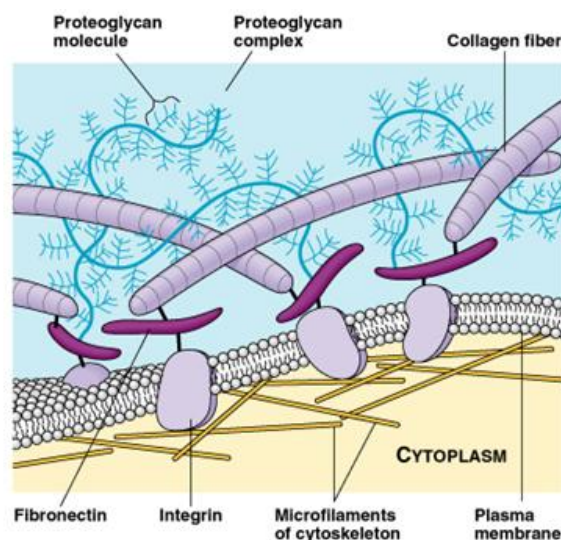


Fig. 3.4 Rappresentazione delle interazioni cellula-ECM. Sono schematizzate le componenti della ECM e la comunicazione integrina-mediata fra fibronectina della matrice extracellulare e microfilamenti di actina del citoscheletro della cellula.

Un tipo specifico di ECM è la membrana basale, associata prevalentemente alle cellule epiteliali, endoteliali e muscolari, le divide dal tessuto connettivo sottostante. Tale membrana influenza il metabolismo cellulare, promuove la sopravvivenza, la proliferazione, la differenziazione e la migrazione delle cellule, e rappresenta una barriera meccanica alla

progressione di tumori.²⁸⁷ E' costituita prevalentemente da fibre collagene di tipo IV e dal punto di vista meccanico è caratterizzata da una elevata resistenza alla trazione e fornisce un supporto elastico.²⁸⁸

Abbiamo visto che nel sistema nervoso centrale (SNC) soltanto il 15-25% del volume è occupato dallo spazio extracellulare, mentre la maggior parte del volume del SNC consiste di elementi cellulari quali neuroni, glia, processi astrocitici e vasi sanguigni.^{100,101} L'ambiente della matrice extracellulare del cervello normale contiene alti livelli di acido ialuronico e proteoglicani. I livelli di proteine fibrose nel cervello normale sono bassi rispetto al tessuto connettivo al di fuori del sistema nervoso centrale.^{29,101,103} Le proteine fibrose si ritrovano principalmente associate alle membrane basali del sistema vascolare cerebrale e comprendono collagene, fibronectina e laminina.¹⁰² Tuttavia, il microambiente ECM in presenza di neoplasie cerebrali differisce da quello del cervello normale e varia a seconda della tipologia tumorale e del grado di malignità.

3.3.2 Trasduzione dei segnali meccanici

Le cellule percepiscono i segnali meccanici esterni, attraverso le giunzioni cellulari, e li convertono in risposte biomeccaniche che influenzano la comunicazione intracellulare e quindi il comportamento della cellula. Studi di meccano-trasduzione del segnale hanno dimostrato che la risposta cellulare a forze meccaniche è intrinsecamente accoppiata all'organizzazione interna del citoscheletro e all'adesione della cellula ad altre cellule e alla matrice extracellulare circostante.²⁸⁹ Sono stati individuati nelle cellule vari sensori meccanici che rispondono a forze di intensità differente, tra cui le giunzioni cellula-cellula e cellula-ECM. Tali giunzioni hanno un ruolo prioritario nella formazione dei tessuti, si dividono in giunzioni occludenti, che formano una barriera di permeabilità selettiva per le molecole (*tight junctions*), giunzioni comunicanti, che permettono lo scambio di segnali chimici tra cellule adiacenti (*gap junction*) e giunzioni ancoranti.

Le giunzioni ancoranti sono di grande importanza per le proprietà meccaniche dei tessuti poiché facilitano la comunicazione fra cellule e ambiente esterno attraverso forze fisiche.²⁹⁰

Tali giunzioni sono costituite da proteine 'ancora' intracellulari e da proteine trans-membrana di adesione.²⁹¹ Le proteine ancora sono localizzate sul versante citoplasmatico della membrana plasmatica e connettono la giunzione ancorante ai filamenti di actina e ai filamenti intermedi,²⁹² mentre le proteine trans-membrana di adesione possiedono una coda citoplasmatica che le connette a una o più proteine ancora intracellulari, e un dominio extracellulare con cui interagiscono con la ECM o con un dominio extracellulare di specifiche proteine di adesione trans-membrana espresse su altre cellule.²⁹³ La maggior parte delle cellule sono ancoraggio-dipendenti quindi, per sopravvivere, proliferare e funzionare correttamente, hanno bisogno di connettersi alla ECM (Fig. 3.5).²⁹⁴

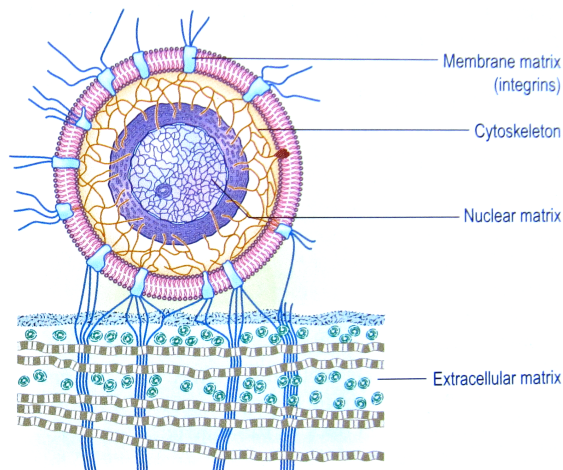


Fig. 3.5 Rappresentazione schematica delle connessioni e interazioni fra cellula e matrice extracellulare.

D'altra parte, la degradazione regolata delle macromolecole di ECM è fondamentale per una varietà di importanti processi biologici, come la migrazione cellulare. Ricordiamo, ad esempio, che enzimi proteolitici extracellulari secreti localmente dalle cellule degradano le componenti della matrice e facilitano la migrazione cellulare.²⁹⁵

In conclusione numerosi dati dimostrano che le forze meccaniche e lo scambio di segnali meccanici via cellula-cellula e cellula-ECM, così come l'organizzazione spaziale di cellule e tessuti, hanno un ruolo cruciale nella regolazione della crescita cellulare, migrazione e differenziazione.^{296,297} Le forze esterne e le forze generate dalle cellule stesse operano in maniera coordinata per mantenere la struttura cellulare e tissutale e l'omeostasi che risulta alterata in condizioni patologiche quali il cancro.

3.4 Meccanica dei tessuti e tumorigenesi

I tumori sono caratterizzati da una crescita incontrollata di cellule anormali, che hanno subito mutazioni del DNA. Il gene più comunemente mutato nei tumori umani è l'oncosoppressore *p53*, che promuove la riparazione dei danni subiti al DNA e l'apoptosi (morte cellulare programmata). L'accumulo di mutazioni del DNA promuove lo sviluppo di tumori.

La ricerca sul cancro è sempre stata focalizzata sulle modificazioni genetiche e biochimiche delle cellule, solo recentemente si sta affermando l'importanza delle proprietà meccaniche delle cellule e dei tessuti nello sviluppo e nella progressione del tumore. Durante la crescita dei tumori solidi, le cellule cancerose sono sottoposte a molti tipi differenti di forze meccaniche come conseguenza della proliferazione incontrollata in uno spazio limitato.^{30,99} In effetti i tessuti tumorali mostrano caratteristiche meccaniche peculiari: un aumento delle fibre di collagene con conseguente maggiore rigidità della ECM,²⁹⁸ un aumento della pressione interstiziale dovuto alla alterata permeabilità vasale e al ridotto drenaggio linfatico con formazione di edemi,^{299,300} e un aumento delle forze di compressione interne dovute alla crescita del tumore.³⁰¹ Questi dati suggeriscono che le cellule tumorali esibiscono proprietà meccaniche molto differenti rispetto alla loro controparte normale.

In conclusione, questi studi dimostrano un comportamento atipico delle cellule e dei tessuti neoplastici, dovuto alle interazioni con la matrice extracellulare e con l'ambiente circostante.

3.5 Microscopia a forza atomica e spettroscopia di forza

La microscopia a forza atomica (AFM – *Atomic Force Microscopy*) è una tecnica di microscopia di superficie ampiamente utilizzata in grado di ricostruire la morfologia 3D (topografia) di campioni biologici con risoluzione nanometrica in praticamente qualsiasi condizione ambientale, compresi liquidi e mezzi fisiologici. Questa caratteristica unica rende la AFM una tecnica chiave per eseguire immagini ad alta risoluzione di cellule e tessuti nelle loro condizioni naturali.³⁰²

Il principio di funzionamento della AFM è distante dalle tecniche di *imaging* convenzionali, quali la microscopia ottica ed elettronica.

Il componente principale di un microscopio a forza atomica è il *cantilever*, una trave sottile, solitamente in silicio, alla cui estremità è montata una punta nanometrica, anch'essa in silicio (Fig. 3.6). Un controllo elettronico dedicato permette di scansionare il campione biologico utilizzando la punta. Durante questa scansione, la punta ricostruisce la topografia della superficie esplorata. Le informazioni derivanti dall'AFM dipendono dall'interazione locale punta-campione. Le forze di interazione provocano la deflessione, laterale o verticale, del *cantilever*. Per misurare tale deflessione si utilizza un sistema di rivelazione basato su un laser focalizzato sul *cantilever*, che viene riflesso da esso per incidere poi su un fotodiodo (Fig. 3.6). Il fotodiodo, è suddiviso in 4 quadranti, ed il segnale misurato in ognuno di essi, viene comparato per ottenere il segnale relativo alla deflessione (Fig. 3.7). In questo modo è possibile tradurre in volt piccolissime deflessioni del *cantilever*.

Il movimento di avvicinamento della punta al campione, l'entrata in contatto con la superficie e la scansione dell'area da analizzare sono affidati a motori piezoelettrici (piezo) in x,y e z, in

3. Biomeccanica e Microscopia a Forza Atomica

grado di compiere spostamenti dell'ordine delle distanze atomiche (\AA) con elevata precisione e scansionare aree dell'ordine dei $100\text{ }\mu\text{m}$.³⁰³ Un microscopio a forza atomica può operare in diversi modi di funzionamento, e in ognuno di essi si sfruttano diverse proprietà del *cantilever*. In alcuni casi è preferibile usare *cantilever* con costante elastica piccola, poiché è necessaria l'applicazione di una forza minore, a parità di deflessione, rispetto ad una leva con costante elastica alta. Sono disponibili *cantilever* con costante elastica che va da 0.005 N/m fino a 40 N/m .

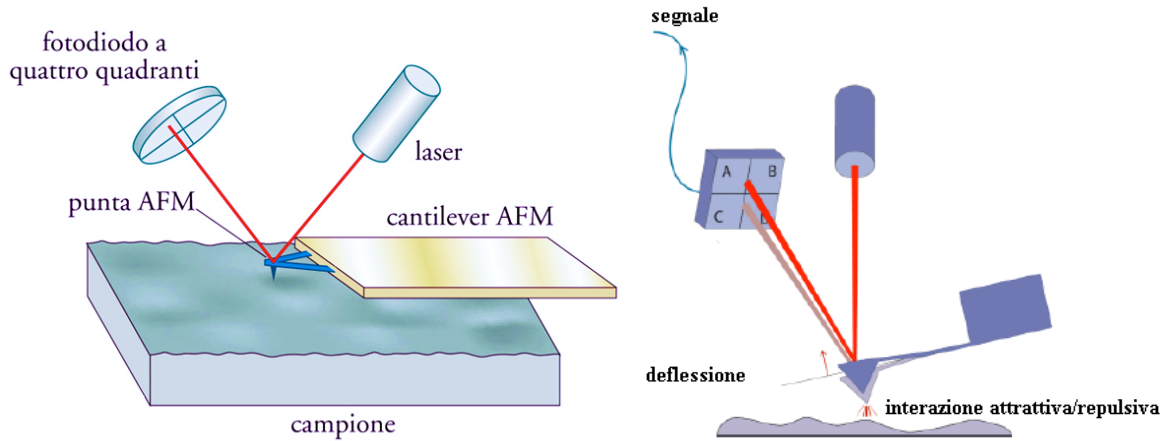


Fig. 3.6 Rappresentazione di un AFM. Il cantilever interagisce con il campione, e tale interazione è misurata tramite un sistema di laser e fotodiodo.

Fig. 3.7 Schema della rivelazione della deflessione del cantilever. I segnali derivanti dai quadranti A,B,C,D del rivelatore vengono confrontati per calcolare il segnale di deflessione del cantilever.

Oltre a scopi di *imaging*, la punta AFM può essere utilizzata per effettuare esperimenti di spettroscopia di forza in grado di sondare le proprietà meccaniche (rigidità, adesione) di campioni biologici con una risoluzione laterale senza precedenti (Fig. 3.8).

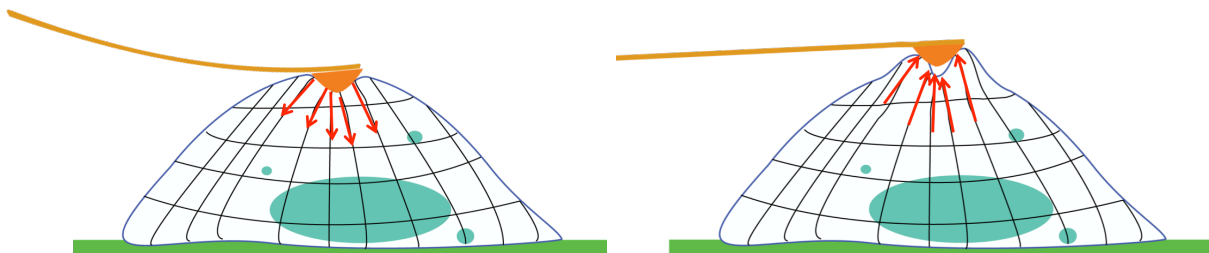


Fig. 3.8 Nell'immagine a dx la punta AFM sonda la rigidità della cellula; nell'immagine a sn, nella fase di allontanamento dalla cellula, ne sonda l'adesione.

Durante un esperimento di spettroscopia di forza la punta si avvicina al campione (fase di *approach*) fino ad entrare in contatto con esso (*indentazione*), preme sulla superficie del campione fino ad un valore massimo della forza, scelto in base al campione che si sta studiando, e poi si ritrae allontanandosi dalla superficie (fase di *retract*). Una rappresentazione del movimento verticale della punta è mostrata in Figura 3.9.

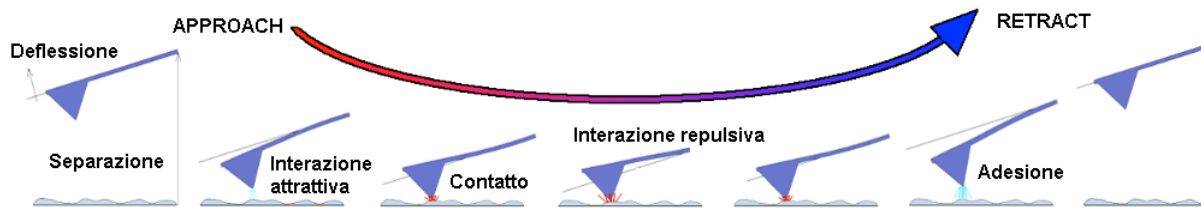


Fig. 3.9 Rappresentazione schematica del movimento verticale della punta durante le fasi di approach e retract in un esperimento di spettroscopia di forza.

Attraverso la spettroscopia di forza è possibile analizzare singoli punti del campione o scansionare un'area ed ottenere una mappa delle caratteristiche biomeccaniche. Supponendo di studiare un singolo punto del campione il risultato dell'esperimento sarà una curva forza-separazione rappresentata dalle curve *approach* e *retract* mostrate in Figura 3.10.

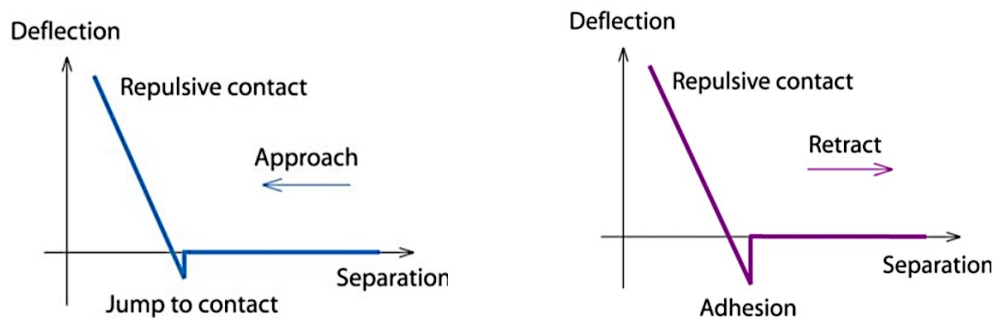


Fig. 3.10 (a) Curva di *approach*. La punta parte lontano dal campione in una situazione di equilibrio, avvicinandosi sperimenta una forza attrattiva e 'salta in contatto' con la superficie, la punta preme fino ad una deflessione massima del cantilever. (b) Raggiunta la deflessione massima inizia la fase di *retract* in cui la punta si allontana dal campione, idealmente ripercorrendo l'*approach*, sperimentando una forza di adesione dovuta all'interazione punta-campione, ed infine perde il contatto con la superficie e si allontana.

Grazie ad una corretta calibrazione della punta (si veda la sezione materiali e metodi) è possibile tradurre la deflessione, misurata in V, in forza, ottenendo una curva forza-distanza. Per ottenere una mappa del campione vengono registrate curve forza-distanza per ogni pixel scansionato.

Dall'analisi della curva forza-distanza è possibile risalire alle caratteristiche biomeccaniche locali del campione.

3.5.1 Stiffness del campione biologico: analisi Herziana delle curve forza-distanza

Le curve mostrate in Figura 3.10 sono curve ideali per un materiale rigido, in realtà le curve che si ottengono da un esperimento su campioni biologici hanno un andamento frutto di molteplici interazioni, dunque presentano un'adesione più complessa, sono caratterizzate da isteresi e spesso, per tessuti molto soffici, risulta difficoltoso individuare precisamente il punto di contatto punta-campione poiché la compressione iniziale della superficie determina una deflessione molto piccola del cantilever (Fig. 3.11, Fig. 3.12).

Curva forza-distanza: Approach

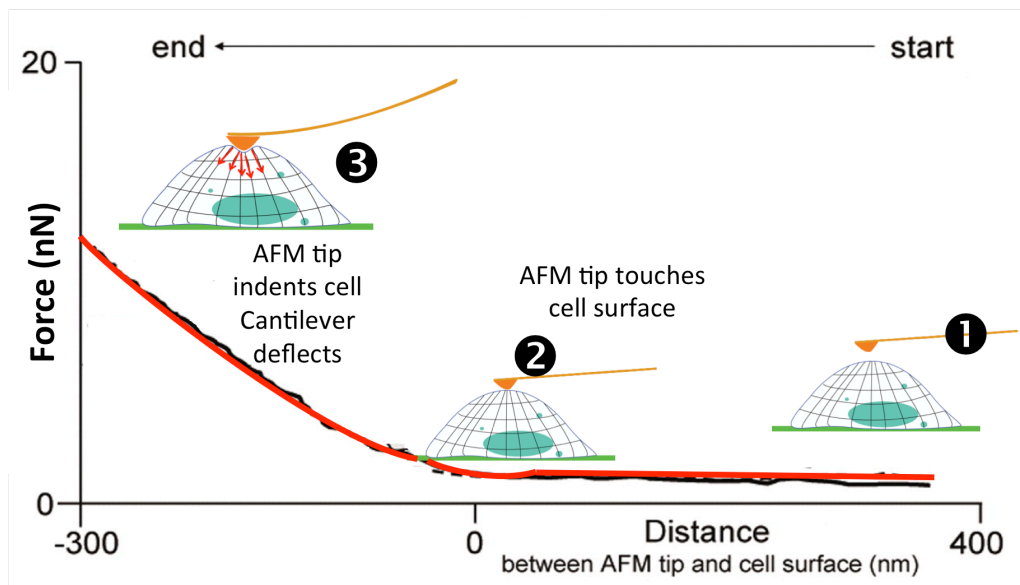


Fig. 3.11 Curva di approach di un campione biologico che, come tale, non rispetta le caratteristiche ideali del materiale rigido. Non è identificabile un punto preciso in cui la punta AFM ‘salta in contatto’ con il campione, la curva mostra piuttosto un graduale incremento della forza.

Curva forza-distanza: Retract

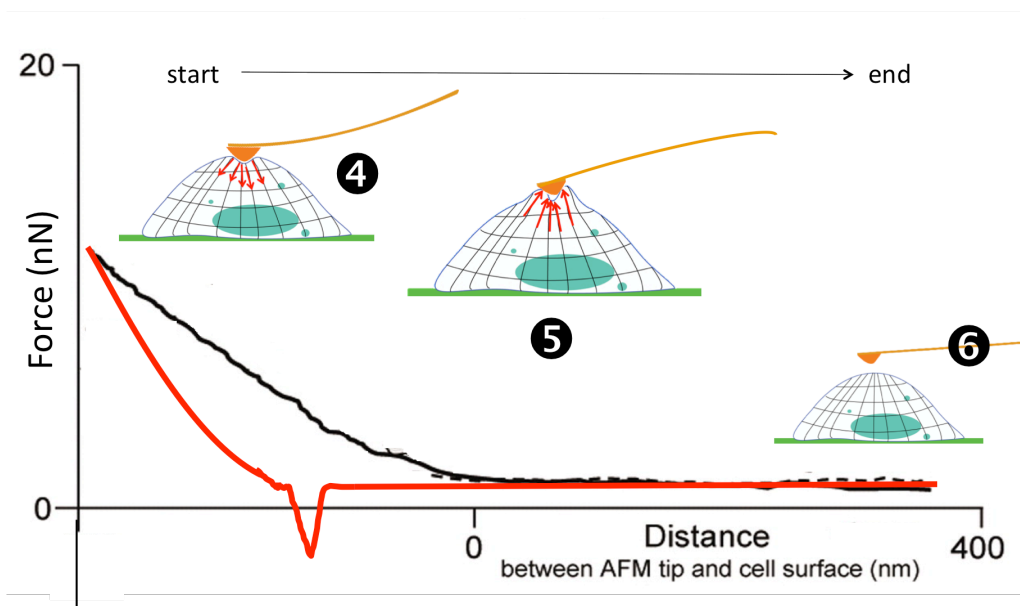


Fig. 3.12 Rappresentazione grafica della curva forza-distanza di un campione biologico, fase di *retract*.

Dall'analisi delle curve forza-distanza è possibile risalire alle caratteristiche biomeccaniche locali del campione. In particolare, per ottenere informazioni sulla rigidità del campione si può ricavare il modulo di Young tramite il modello di Hertz per un indentatore conico.

Il modello descrive il contatto elastico tra un corpo conico (punta dalla geometria conica che entra in contatto con la superficie del campione) ed un corpo generico (campione da analizzare). Le ipotesi previste dalla teoria sono: contatto elastico tra i corpi, costituiti da materiali isotropi e omogenei, area di contatto piccola rispetto alla dimensione dei corpi, assenza di attrito (assenza di forze laterali e tangenziali), assenza di adesione tra i corpi e piccole deformazioni in seguito al contatto.

Tale modello prevede che la forza ($F(\delta)$) sia proporzionale quadrato della profondità di indentazione (δ).

$$F_{cono}(\delta) = \frac{2E \tan(\alpha)}{\pi(1 - \nu^2)} \delta^2 \quad [6]$$

Dove α rappresenta l'angolo di apertura del cono.

In realtà le approssimazioni previste dal modello spesso non sono valide, ad esempio campioni come molecole, cellule e tessuti sono anisotropi con una disomogeneità nella struttura tridimensionale e presentano attrito e adesione in caso di contatto. Tuttavia è possibile applicare il modello di Hertz anche a questi campioni tenendo conto che lo si può considerare valido per piccole profondità di indentazione, dal momento che per piccoli δ le forze di frizione laterali e tangenziali e le forze di adesione si possono trascurare.

3.5.2 Forze viscoelastiche

La materia biologica è caratterizzata da un comportamento viscoelastico, ossia mostra caratteristiche viscosi ed elastiche. Pertanto in seguito all'applicazione di una forza esterna di tensione o compressione un campione biologico mostra una dipendenza dal tempo della deformazione. In particolare un materiale viscoelastico presenta le seguenti caratteristiche:

- Se la sollecitazione meccanica è costante nel tempo, la deformazione aumenta nel tempo (*creep*).
- Se la deformazione si mantiene costante, allora la sollecitazione decresce nel tempo (rilassamento).
- La rigidità del materiale dipende dalla velocità con cui è applicata la sollecitazione meccanica, nel caso specifico dell'AFM dalla velocità di indentazione della punta.
- In caso di *cyclic loading* si osserva dissipazione di energia, e dunque isteresi.
- Presenza di forze di adesione.

L'analisi delle curve forza-distanza può fornire informazioni sulle proprietà viscoelastiche quali l'isteresi (H), le forze di adesione e il lavoro di adesione (W).

Isteresi

Per valutare quantitativamente il contributo delle forze dissipative di un materiale viscoelastico sottoposto a sollecitazioni meccaniche è utile stimare l'energia dissipata durante il *cyclic loading*. Effettuando un esperimento di spettroscopia di forza su un campione viscoelastico, la curva *retract* non segue l'*approach*, proprio per effetto delle forze dissipative, e l'area racchiusa dalle due curve rappresenta l'isteresi (H), ossia l'energia dissipata.

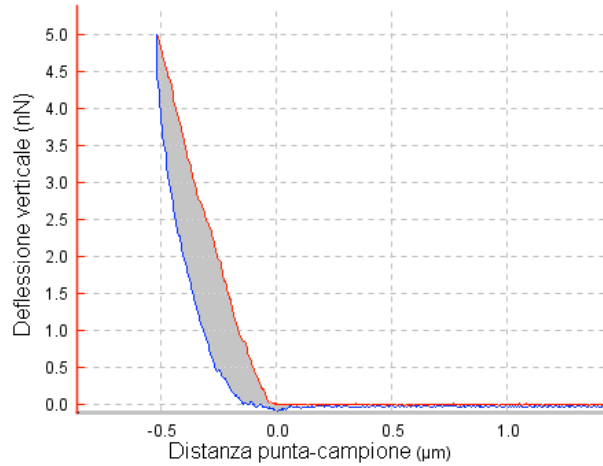


Fig. 3.14 Curva forza distanza, in rosso la fase di approach, in blu la retract. L'area in grigio rappresenta l'isteresi (H).

In Figura 3.14 è rappresentato un ciclo completo di sollecitazione meccanica, ossia la punta si avvicina al campione entra in contatto, preme su di esso fino ad esercitare il valore della forza massima settato, e si ritrae allontanandosi da esso.

Durante il ciclo viene dissipata energia, quantificabile stimando l'isteresi che è definita dalla seguente relazione:

$$H = \frac{\int_0^\delta F_a(\delta) d\delta - \int_0^\delta F_r(\delta) d\delta}{\int_0^\delta F_a(\delta) d\delta} \quad [7]$$

Dove F_a e F_r rappresentano rispettivamente la curva di *approach* e *retract*. Dalla definizione si vede che l'isteresi è una grandezza adimensionale, poiché è normalizzata all'energia necessaria per indentare il campione fino alla profondità δ .

Adesione

La forza di adesione tra due superfici dipende dalle proprietà e dalla geometria dei materiali. Le forze di adesione sono la somma di diversi contributi, forze di Van der Waals, forze elettrostatiche, forze dovute alla formazione di legami chimici e forze capillari.

In un esperimento di spettroscopia di forza, durante la fase di *retract*, la punta è in contatto con il campione fintanto che la forza del *cantilever* supera la forza di adesione punta-campione.

Il lavoro necessario per rimuovere la punta dal campione è definito lavoro di adesione, ed è rappresentato in Figura 3.13 dall'area in grigio.

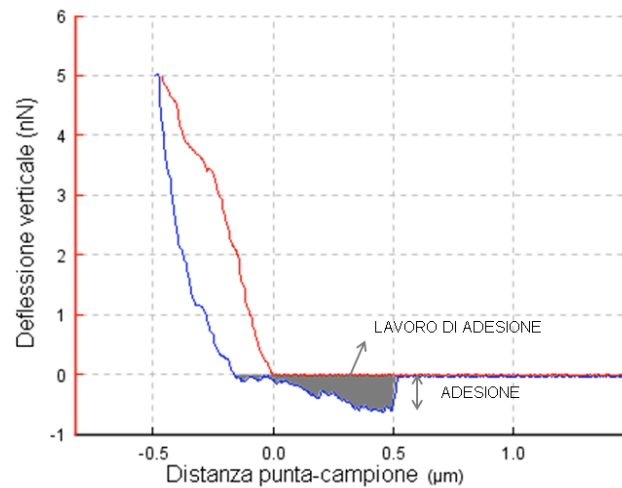


Fig. 3.13 Curva forza distanza, in rosso l'*approach*, in blu la *retract*. L'area in grigio rappresenta il lavoro di adesione (W).

È possibile misurare il massimo della forza di adesione, semplicemente individuando il minimo della curva di *retract*, e stimare il lavoro di adesione valutando l'area compresa tra la *baseline* e la *retract*.

MATERIALI E METODI

4.1 Approvazione del Comitato Etico

Presentato il progetto di ricerca, il Comitato Etico dell'Università degli Studi di Roma Sapienza esprime parere favorevole alla conduzione dello studio pilota, da eseguirsi su una dimensione campionaria stabilita di pazienti neurochirurgici, presso il reparto di Neurochirurgia del Policlinico Umberto I.

Tutti i pazienti arruolati sono stati informati sul progetto di ricerca al quale avrebbero partecipato e gli è stata rilasciata una nota informativa dettagliata sullo studio in corso. I pazienti hanno deciso liberamente di partecipare allo studio e hanno firmato un modulo di consenso informato appositamente stilato e un consenso al trattamento dei dati personali per fini scientifici.

4.2 Popolazione di pazienti

Sono stati arruolati per lo studio 15 pazienti, di cui 9 maschi e 6 femmine. L'età dei pazienti studiati è compresa nell'intervallo fra 27 e 84 anni (età media 56 anni).

In 7 pazienti si è sospettata la presenza di una lesione di natura gliale (7 maschi), in 8 pazienti si è ipotizzata la presenza di un meningioma (di cui 6 femmine e 2 maschi). Fra questi ultimi, una paziente era già stata in precedenza operata con diagnosi di meningioma di grado II sec. WHO.

Relativamente alla sede anatomica, i pazienti con glioma presentavano lesioni localizzate in sede cortico-sottocorticale temporale destra (due pazienti), temporo-parietale sinistra, frontale destra (due pazienti), fronto-temporo-insulare destra, frontale sinistra. Nei pazienti con meningioma le lesioni si sono presentate così distribuite: due meningiomi del basicranio a sinistra (forame giugulare-rocca petrosa e forame magno), cinque meningiomi di convessità (due frontali destri, un frontale sinistro, un fronto-parietale destro e un fronto-parietale sinistro) e una meningiomatosi multipla (meningiomi parietale destro e sinistro, parafalciale sinistro, tentoriale sinistro e occipitale destro).

I pazienti arruolati non presentavano grossolani deficit neurologici e mostravano buone condizioni cliniche generali, fatta eccezione per quattro casi. Due pazienti (un sospetto glioma che giungeva alla nostra osservazione per sindrome frontale, e un sospetto meningioma) sono andati incontro ad un rapido deterioramento dello stato di coscienza durante il ricovero che ha reso necessario un intervento urgente; un paziente con sospetto meningioma fronto-parietale sinistro presentava un deficit di forza brachio-cirale destro, con sotto-slivellamento dell'arto superiore destro e dell'arto inferiore destro alle prove di Mingazzini; la paziente con recidiva di meningioma presentava condizioni cliniche generali scadute e all'esame obiettivo neurologico manifestava una emianopsia laterale omonima destra; un sotto-slivellamento di entrambi gli arti inferiori al mantenimento della prova di Mingazzini, con deficit di forza prevalente a destra; deambulazione possibile per pochi metri con ausilio bilaterale.

4.3 Prelievo chirurgico e preparazione dei campioni

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad intervento neurochirurgico di asportazione della neoformazione, in alcuni casi con l'ausilio del neuronavigatore intraoperatorio. Durante l'intervento operatorio sono stati prelevati i campioni da analizzare. I campioni sono stati prelevati da più regioni differenti del tumore e da ciascuna regione sono stati prelevati più campioni. In particolare, per ciascun tumore, sono stati prelevati campioni nella zona più superficiale della lesione, all'interfaccia con il tessuto cerebrale sano; campioni nella zona più profonda del tumore; e altri in zone di profondità intermedia. Più campioni sono stati prelevati nelle varie regioni per caratterizzare con maggiore affidabilità i tumori esaminati; inoltre,

sono state scelte per il prelievo zone profonde e superficiali al fine di identificare eventuali differenze nel comportamento biomeccanico fra il *core* tumorale e il margine d'invasione.

Per i tumori asportati *en bloc* la selezione e il prelievo del tessuto neoplastico da analizzare è avvenuta immediatamente dopo la rimozione della lesione, in sala operatoria, su un piano sterile appositamente preparato per la procedura, con micro-bisturi e pinze atraumatiche per tumore, al fine di minimizzare eventuali insulti meccanici sui delicati campioni biologici. Per i tumori asportati con tecnica *piecemeal* i campioni sono stati prelevati intra-operatoriamente con strumentario microchirurgico dalla superficie in profondità, man mano che procedeva l'asportazione chirurgica.

Per l'analisi delle proprietà meccaniche dei campioni biologici è necessario che i tessuti non siano alterati dalle procedure di fissaggio standard utilizzate per le analisi istologiche. D'altronde, dopo le misure tramite AFM, i campioni non sono più nelle condizioni di essere allestiti per le analisi istologiche. Per ovviare a questo problema tecnico noto e preservare le proprietà biomeccaniche dei tessuti in esame senza rinunciare al controllo istologico degli stessi si è proceduto sezionando ciascun campione in due e inviando le due metà contigue per le analisi AFM e istologiche che sono state così eseguite entrambe, in regioni contigue di uno stesso campione.

4.4 Allestimento dei campioni per le misure AFM

I campioni di tessuto tumorale destinati all'analisi mediante microscopia a forza atomica sono stati immersi in una soluzione di Ringer lattato integrata con glucosio e inibitori delle proteasi e conservati a temperatura di $\sim 4^{\circ}$ per minimizzare la degradazione tissutale. Tutti i campioni sono stati analizzati entro 24 ore dall'asportazione del tumore.

Per procedere alle misurazioni AFM in ambiente liquido, i campioni, delle dimensioni di circa 0.5×0.5 cm, sono stati fissati ciascuno su una capsula di Petri con un sottile strato di colla biocompatibile ad asciugatura rapida (Fig. 4.1) e vi è stata aggiunta la soluzione di Ringer integrata.

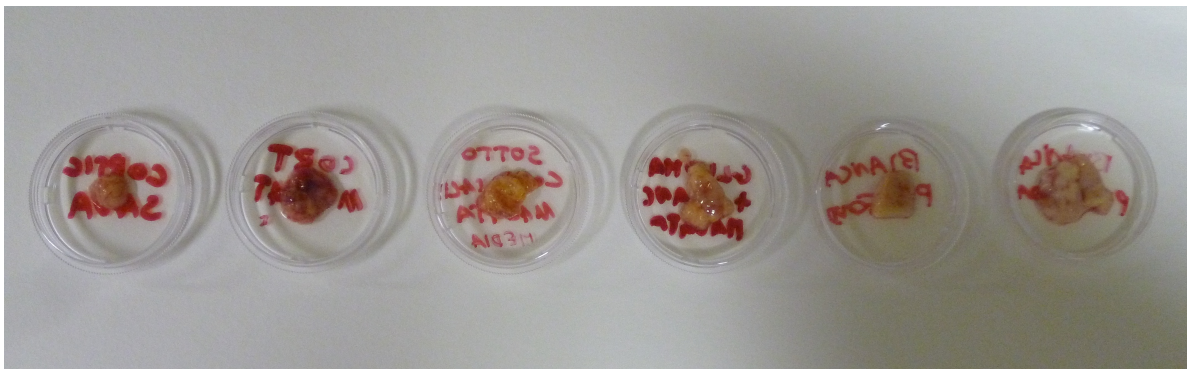


Fig. 4.1 Campioni tissutali di tumori cerebrali fissati su capsule di Petri per l'analisi AFM. Sono segnalate le varie regioni da cui sono stati prelevati i campioni procedendo dalla superficie in profondità.

4.5 Preparati istologici

Ematossilina-Eosina

Per la diagnosi istologica i campioni tissutali sono stati esaminati mediante microscopia ottica dopo colorazione con ematossilina-eosina.

I campioni destinati all'analisi istologica sono stati fissati in formalina, in seguito inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di $4 \mu\text{m}$ di spessore secondo la procedura standard seguita presso il Dipartimento di Anatomia Patologica del Policlinico Umberto I, Sapienza Università di Roma. Si è quindi proceduto alla colorazione con ematossilina-eosina che, come è noto,

colora in blu-violetto i nuclei cellulari (componenti basofile colorate dall'ematossilina), e in rosa il citoplasma e le fibre reticolari della matrice extracellulare (componenti acidofile colorate dall'eosina).

Oltre a questa colorazione istologica standard necessaria per la diagnosi, al fine di mettere in evidenza componenti tissutali specifiche, sono state eseguite altre due procedure non praticate di routine: la colorazione istologica di Gomori e la colorazione istochimica con Alcian blu.

Gomori

La colorazione di Gomori è una colorazione istologica elettiva per le fibre connettivali reticolari. Il colorante utilizzato è a base di argento e la colorazione sfrutta l'affinità dell'argento per le proteine costituenti le fibre reticolari. Ne deriva un tessuto in cui le fibre appaiono dal nero intenso al marrone scuro, su uno sfondo che va dal grigio al giallo al marroncino chiaro.

Questa colorazione è stata utilizzata nello studio al fine di mettere in evidenza quantitativamente le proteine fibrose nei campioni tissutali esaminati; la concentrazione di tali proteine o l'assenza delle stesse è caratteristica di specifiche condizioni neoplastiche cerebrali e di alcune varianti istologiche delle neoplasie esaminate.

Alcian blu

L'Alcian blu è una ftalocianina rameica per la colorazione dei glicosaminoglicani (GAG) e dei proteoglicani. E' un colorante specifico per le macromolecole sopradette, ma più in generale si lega, in quanto colorante carico positivamente, a tutti i composti aventi radicali acidi liberi. Pertanto, mediante l'uso di Alcian blu vengono evidenziate in blu strutture contenenti DNA, RNA e GAG o solo GAG.

La colorazione con Alcian blu dei preparati è stata utilizzata in questo studio al fine di evidenziare il glicosaminoglicano acido ialuronico nei campioni tissutali, la cui concentrazione nella matrice extracellulare varia considerevolmente, come è noto, in presenza di specifiche patologie neoplastiche cerebrali.

4.6 Misure AFM

Le misure sono state effettuate tramite microscopio a forza atomica JPK Nanowizard II accoppiato ad un microscopio ottico. I campioni sono stati misurati a temperatura ambiente.

Sono stati utilizzati *cantilever MikronMash* in silicio a punta conica, con angolo di apertura 20° , raggio della punta di circa 10 nm e un ampio intervallo di costanti elastiche. Sono state scelte punte con costante elastica minore per tessuti che ci aspettavamo essere più soffici, e punte con costante elastica maggiore per tessuti più rigidi. In particolare, i campioni di tessuto di glioblastoma sono stati analizzati utilizzando *cantilever* con costante elastica $k=0.05 \text{ N/m}$ circa (CSC38, *MikroMash*), invece i meningiomi, in considerazione della loro consistenza significativamente maggiore, sono stati analizzati utilizzando *cantilever* con costante elastica di circa $k=0.08 \text{ N/m}$ (CSC38, *MikroMash*). La costante elastica del *cantilever* è stata accuratamente misurata prima di ogni misura mediante il metodo di calibrazione termica.

Le curve forza-distanza sono state acquisite utilizzando una forza di indentazione pari a 5 nN a differenti *rate* di indentazione nell'intervallo $0.5\text{-}30 \text{ }\mu\text{m/s}$ con l'intento di investigare la risposta viscoelastica dei tessuti. L'analisi Hertziana delle curve è stata effettuata tramite il software JPK *data processing*.

Per compensare le forti corrugazioni di superficie tipiche dei campioni sotto indagine, abbiamo accoppiato il piezo JPK standard - con estensione lungo l'asse z di 15 micron - con un modulo aggiuntivo (JPK *cellHesion module*) che permette di ottenere una maggiore corsa del piezo, con estensione lungo l'asse z molto maggiore (fino ad arrivare a 100 micron).

In Figura 4.2 a-b-c, sono mostrate tre curve forza-distanza rappresentative che descrivono ciascuna un singolo ciclo *approach-retract* della punta del microscopio a forza atomica (linee verdi continue), con la curva di *approach* della punta AFM alla superficie del campione che

porta all'indentazione del campione stesso e alla deflessione del *cantilever* e, successivamente, la curva di *retract* che si ha quando la punta viene ritratta e perde il contatto con la superficie del campione.

La forza di carico massima applicata è stata fissata a 5 nN; con tale forza si è ottenuta una profondità di indentazione che varia approssimativamente nell'intervallo compreso tra circa 100 nm e 600 nm, a seconda delle differenze meccaniche intrinseche di ciascun campione. Le curve di indentazione sono state analizzate usando il modello Hertziano modificato sviluppato in per indentatori conici (Paragrafo 3.5.1):

$$F_{cono}(\delta) = \frac{2E \tan(\alpha)}{\pi(1 - \nu^2)} \delta^2 \quad [6]$$

dove E rappresenta il modulo di Young apparente, ν il coefficiente di Poisson e δ la profondità di indentazione. Il coefficiente di Poisson è stato fissato a 0.5 per dar conto dell'incompressibilità del materiale. È stato considerato un intervallo di indentazione di 0-500 nm, poiché in questo intervallo il modello di deformazione infinitesimale è considerato ancora valido.

Il risultato del fit dei dati secondo il modello di Hertz è rappresentato dalla curva blu in Figura 4.2 a-b-c.

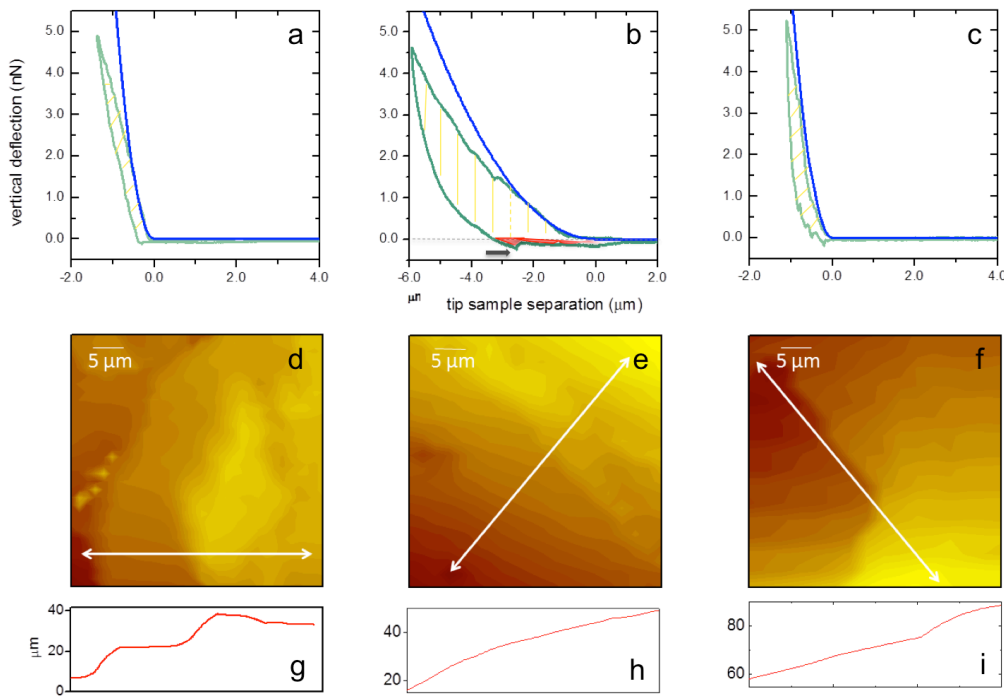


Fig. 4.2 a-b-c: Tipiche curve forza-distanza ottenute su un campione rappresentativo di glioblastoma (a), necrosi tumorale in un glioblastoma (b), meningioma (c); d-e-f: Mappa topografica di una *slice* di tessuto tumorale di glioblastoma (d), di un'area necrotica individuata nella zona più profonda di un glioblastoma (e), di un meningioma (f); g-h-i: *line profile* delle rispettive mappe sovrastanti (rispettivamente d-e-f) ottenute nell'area indicata dalla freccia bianca nelle Figure d-e-f. Sono riportati i valori delle altezze in funzione della posizione sulla mappa lungo la freccia bianca.

La risposta biomeccanica locale dei tessuti tumorali è stata investigata mappando il modulo di Young apparente E ottenuto applicando l'equazione [6]. La dimensione delle mappe è di 40 x 40 μm. Risoluzioni differenti sono state adottate in base al *rate* di indentazione. Mappe 32 x 32 pixel, corrispondenti a una risoluzione spaziale di circa 1250 nm, sono state acquisite nel

caso di frequenza di indentazione di $5 \mu\text{m/s}$. Per tutte le altre frequenze di indentazione, sono state acquisite mappe 8×8 pixel (risoluzione spaziale di $5 \mu\text{m}$). I tempi tipici di acquisizione sono stati di circa 90 minuti per le mappe 32×32 pixel e 10 minuti per le mappe 8×8 pixel a una frequenza di indentazione di $5 \mu\text{m/s}$. Frequenze di indentazione più alte/basse hanno richiesto tempi di acquisizione maggiori/minori.

La stessa procedura di *fit* utilizzata per misurare il modulo di Young permette la contemporanea determinazione dell'*offset* del punto di contatto della punta dell'AFM. La topografia dei tessuti è stata ricostruita direttamente in ambiente liquido, mappando l'*offset* del punto di contatto determinato tramite la procedura di *fit* dell'equazione [6] alla curva di indentazione sperimentale. Tale procedura ci ha permesso di acquisire l'immagine a forza-zero (*zero-force image*) del tessuto analizzato (Fig. 4.2 a-b-c), che fornisce informazioni dirette sulla topologia del tessuto e, allo stesso tempo, minimizza gli effetti di deformazione, come ad esempio lo schiacciamento verticale, indotti dalla forza applicata nelle modalità tradizionali di *imaging* AFM.

In Figura 4.2 a-b-c sono riportate tre tipiche immagini a forza-zero $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ per tre campioni rappresentativi dei tessuti analizzati. Queste immagini mostrano, come detto in precedenza, come i tessuti siano fortemente corrugati, con un rapporto picco-valle di circa 40 micron (Fig. 4.2 d-e-f). La presenza di una tale corrugazione rappresenta un problema noto che rende difficile l'investigazione tramite AFM di ampie aree di tessuto quali quelle prelevate chirurgicamente. Per superare il problema, Plodinec et al., nel loro pionieristico lavoro,²² hanno sviluppato e implementato hardware e software *ad hoc* per il livellamento automatico; ciò ha permesso loro di acquisire mappe di indentazione AFM senza interruzioni fino a dimensioni massime di $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$. Grazie all'aumentata escursione verticale resa possibile dalla combinazione del piezo JPK convenzionale con il modulo aggiuntivo JPK *cellHesion*, disponibile in commercio, siamo riusciti ad acquisire mappe significativamente più grandi, fino a raggiungere la dimensione, ineguagliata, di circa $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. L'acquisizione di mappe di tale grandezza ci ha consentito di aumentare la statistica e di analizzare regioni di tessuto sufficientemente ampie da essere comparate con quelle osservabili all'analisi istologica convenzionale.

Il ruolo giocato dalle forze viscosse nella risposta biomeccanica dei tessuti neoplastici è stato valutato qualitativamente studiando la dipendenza di E dalla frequenza di indentazione. Per valutare anche quantitativamente il contributo delle forze dissipative, abbiamo stimato l'energia dissipata durante il processo di deformazione o isteresi. L'isteresi (H) è stata calcolata come la differenza fra l'area (A_E) sottostante la curva di *approach* ($F_E(\delta)$) e l'area (A_R) sottostante la curva *retract* ($F_R(\delta)$), normalizzata a A_E :

$$H = \frac{\int_0^\delta F_E(\delta) d\delta - \int_0^\delta F_R(\delta) d\delta}{\int_0^\delta F_E(\delta) d\delta} = \frac{A_E - A_R}{A_E} \quad [8]$$

Una rappresentazione grafica di H è fornita in Figura 4.2 a-b-c (aree tratteggiate gialle). È stato appositamente sviluppato un software per calcolare il valore di H dalle curve *approach-retract* e per ottenere mappe che mostrano la distribuzione spaziale di tali valori. Queste mappe rappresentano, per quanto ne sappiamo, le prime mappe di isteresi riportate in letteratura.

Abbiamo misurato la forza di adesione individuando il minimo della curva di *retract* (Fig. 4.2 b, freccia nera), ed il lavoro di adesione misurando l'area compresa tra la *baseline* e la curva di *retract* (Fig. 4.2 b, area rossa).

Calibrazione della punta

Prima di eseguire ciascuna misurazione abbiamo calibrato correttamente la punta, ciò è necessario sia per tradurre il segnale misurato in volt in una misura della forza, sia per ottenere una stima della costante elastica della punta.

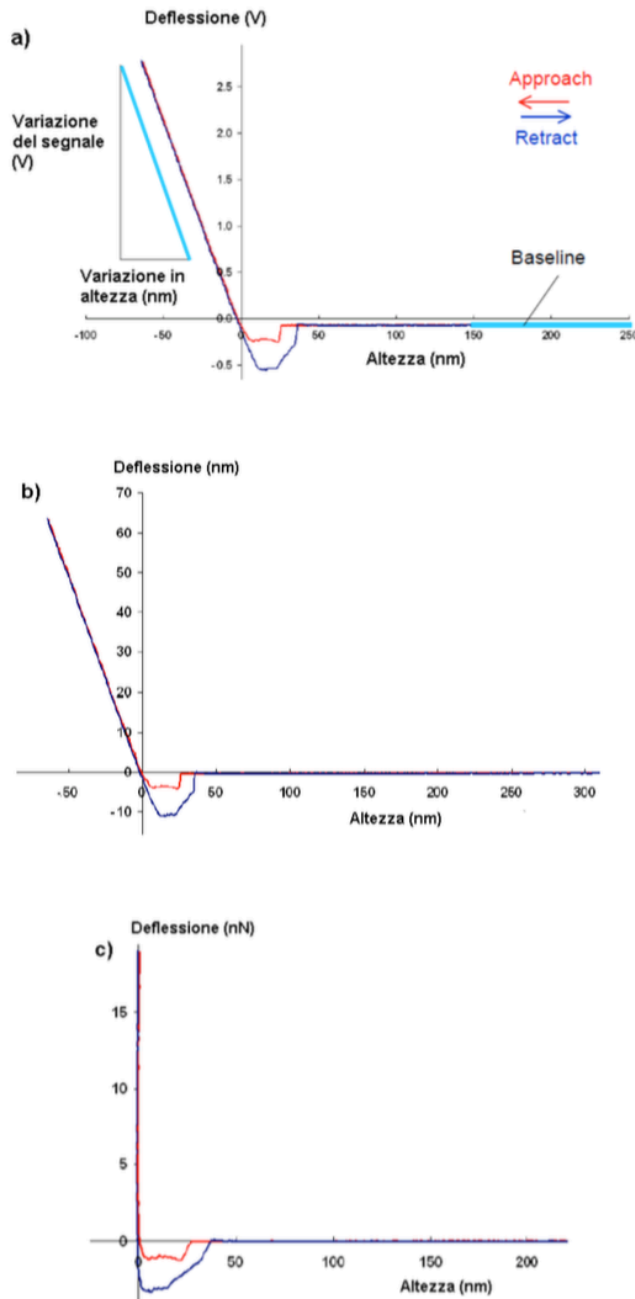


Figura 4.3 a) Curva forza-distanza per una superficie rigida. b) Il segnale in V è stato convertito in nm grazie al fattore di conversione. c) Curva di calibrazione del vetro.

Per prima cosa è stata registrata la curva forza-distanza di un materiale rigido (vetro) ottenendo una misura della deflessione della punta in nm per un dato spostamento dello spot del laser sul fotodiodo. Poiché nella regione attrattiva la curva di un materiale rigido è lineare, è stato semplice calcolare la *sensitivity*, cioè il fattore di conversione V–nm.

In Figura 4.3 a) è stata evidenziata la *baseline* della curva, ottenuta nella regione in cui punta e campione non hanno interazioni, e quindi rappresenta l'*offset* da sottrarre alle curve sperimentali per ottenere il reale valore dell'interazione punta-campione. I dati sperimentali sono pronti per essere convertiti in forza, misurata in nN.

Per un campione rigido, che non va incontro a compressione, quando la punta rimane in contatto e spinge su di esso, la variazione in altezza del piezo coincide con la deflessione del *cantilever*. Si ottiene quindi la curva di calibrazione del vetro mostrata in Figura 4.3 c).

Per quanto riguarda la misura della costante elastica del *cantilever* è stata utilizzata la tecnica basata sul rumore termico (*thermal noise calibration method*). Tale metodo si basa sulla misura delle fluttuazioni libere del *cantilever* e sul fatto che la punta, montata all'estremità del *cantilever*, fluttua a causa del rumore termico.

RISULTATI

5.1 Diagnosi istologica

Dei sette pazienti di cui si sospettava una lesione di natura gliale, in sei è stata posta diagnosi di glioblastoma multiforme (Grado IV sec. WHO), in uno è stato diagnosticato un ascesso cerebrale da *Streptococcus Intermedius*. Negli otto pazienti con sospetto di meningioma cerebrale è stata confermata la diagnosi. In particolare, in cinque è stata posta diagnosi di meningioma meningoteliale (Grado I WHO), in un caso è stato diagnosticato un meningioma psammomatoso (Grado I WHO) e due casi sono risultati essere meningiomi atipici (Grado II WHO), di cui uno recidivo.

5.2 Risultati chirurgici e clinici

I pazienti con glioblastoma hanno subito un'asportazione macroscopicamente totale della lesione (Fig. 5.1 a-f). Nel decorso post-operatorio hanno manifestato buone condizioni cliniche e neurologiche. Cinque pazienti sono stati avviati a trattamento combinato radio- e chemioterapico, secondo linee guida (paragrafo 1.3), un paziente di 84 anni è stato avviato alla sola radioterapia in considerazione dell'età avanzata. Nel periodo post-operatorio, tutti i pazienti operati per glioblastoma sono stati seguiti presso gli ambulatori neuro-oncologici della neurochirurgia e sottoposti a stretti *follow-up* sia clinici sia neuro-radiologici. In cinque pazienti si è assistito ad una ripresa di malattia (Fig. 5.1 g-i). In un caso di recidiva con comportamento particolarmente aggressivo evidenziato alle immagini di risonanza magnetica seriate, il paziente è stato sottoposto ad un ulteriore intervento chirurgico ottenendo una buona asportazione della recidiva, senza compromissione delle funzioni neurologiche. Nel breve periodo la lesione ha nuovamente recidivato, nonostante le terapie concomitanti. Attualmente il paziente presenta una grave emiparesi brachio-crurale sinistra e non è in grado di deambulare autonomamente.

Il paziente con ascesso cerebrale è stato sottoposto, oltre che ad asportazione dell'ascesso, a craniotomia decompressiva in considerazione dell'importante edema cerebrale e dello stato comatoso con anisocoria che lo hanno condotto all'intervento in urgenza. Nel post-operatorio il paziente ha intrapreso una terapia antibiotica mirata e, in seguito, è stato sottoposto a cranioplastica, con buoni risultati chirurgici e clinici.

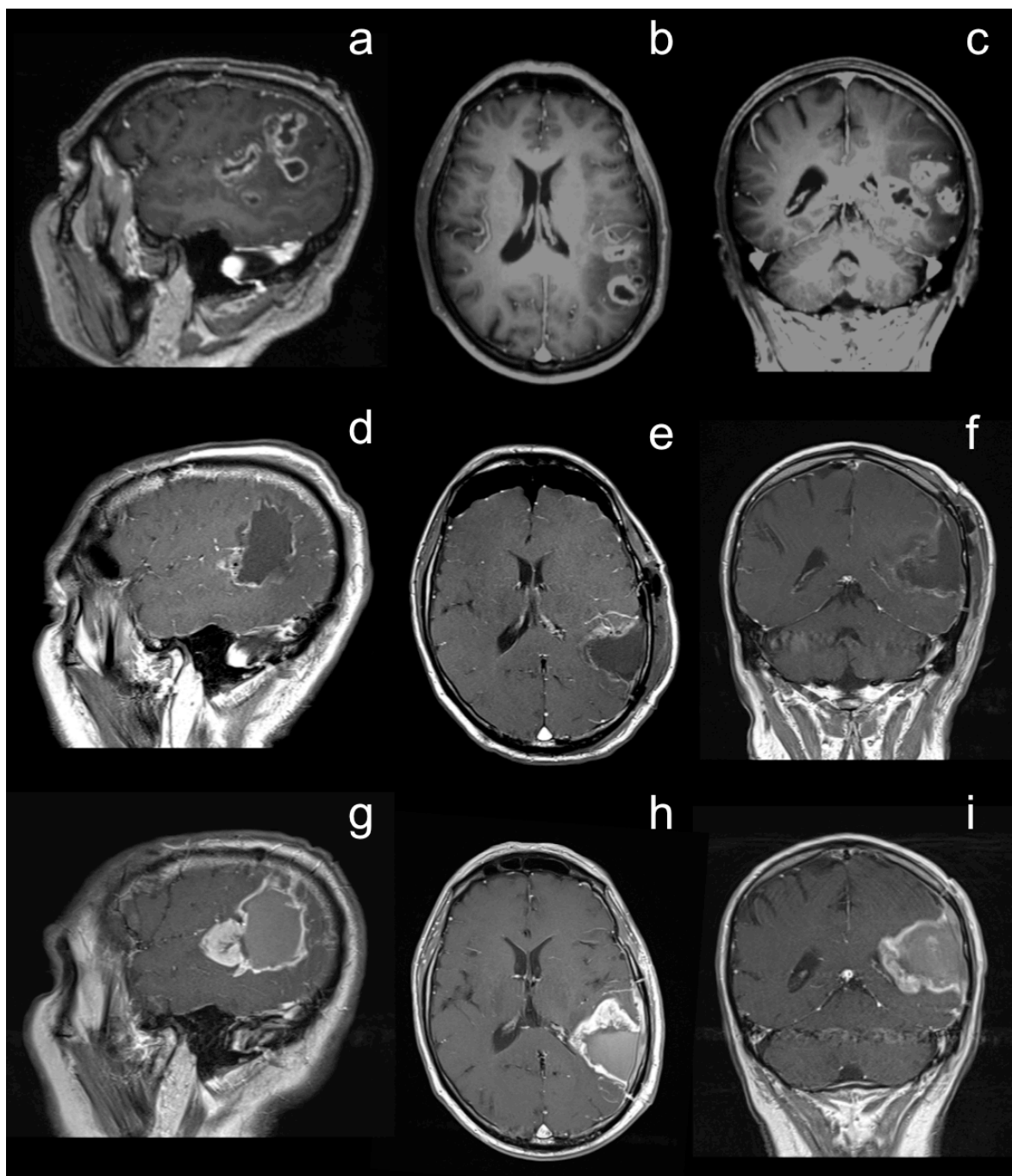


Fig. 5.1 Risonanza magnetica encefalo; sequenze pesate in T1 dopo somministrazione di gadolinio. Immagini acquisite sui piani sagittale (a), assiale (b) e coronale (c) documentano la presenza di un'area di alterata intensità di segnale, con disomogeneo potenziamento dopo somministrazione di mezzo di contrasto (mdc), localizzata in sede cortico-sottocorticale temporo-parietale sinistra. I reperti sono compatibili con la presenza di tessuto patologico neoformato della serie gliale di alto grado.

Risonanza post-operatoria precoce (a 24 ore) del caso in a,b,c acquisita sui piani sagittale (d), assiale (e) e coronale (f) documenta l'asportazione della lesione neoformata e gli esiti cranici e cerebrali dell'intervento chirurgico, con evidenza di cavo a contenuto fluido in sede temporo-parietale sinistra. Nelle adiacenze del cavo chirurgico le immagini contrastografiche non mostrano potenziamenti focali patologici compatibili con residui nodulari del tessuto patologico asportato.

Risonanza post-operatoria a 45 giorni del caso in a,b,c acquisita sui piani sagittale (g), assiale (h) e coronale (i) documenta la comparsa nelle adiacenze del cavo chirurgico, in sede temporo-insulare, paratrigonale e talamica posteriore, di un intenso e disomogeneo potenziamento delle dimensioni massime di 32 x 18 mm sul piano assiale, dopo somministrazione di mdc. Questi reperti sono indicativi di recidiva di lesione gliale di alto grado.

5. Risultati

I pazienti con meningioma cerebrale hanno subito un'asportazione macroscopicamente totale della lesione (Fig. 5.2, Fig. 5.3); nella paziente con meningiomatosi ciò è avvenuto nel corso di più interventi chirurgici. Nel decorso post-operatorio i pazienti hanno presentato buone condizioni cliniche generali e neurologiche. I pazienti che presentavano deficit di forza all'esame obiettivo all'ingresso in reparto sono stati avviati nel post-operatorio a cicli di fisiochinesiterapia ottenendo un buon miglioramento del quadro neurologico d'ingresso.

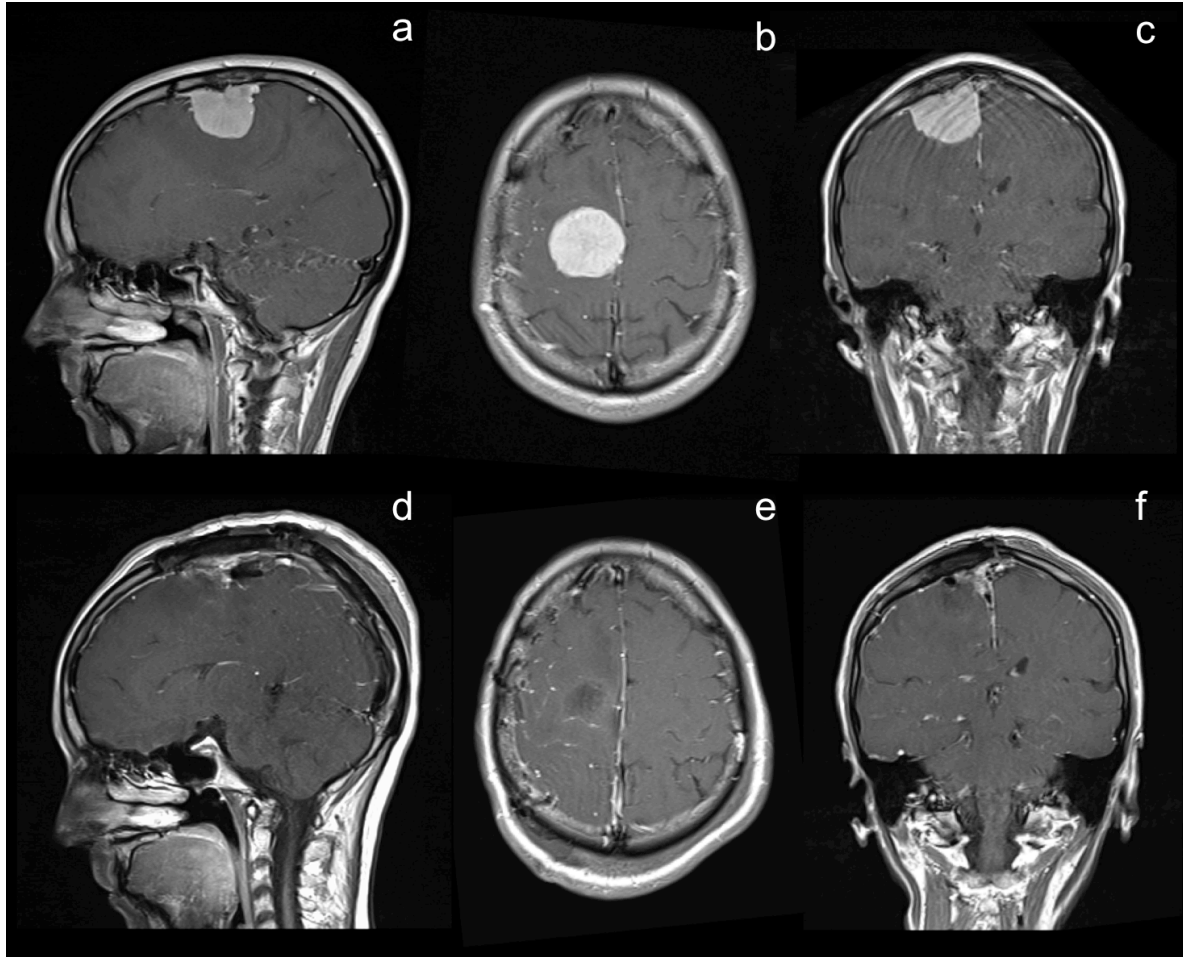


Fig. 5.2 Risonanza magnetica encefalo; sequenze pesate in T1 dopo somministrazione di gadolinio. Immagini acquisite sui piani sagittale (a), assiale (b) e coronale (c) documentano la presenza di una formazione espansiva extrassiale a morfologia rotondeggiante, con potenziamento contrastografico intenso ed omogeneo, delle dimensioni di circa 32 x 30 x 34 mm (diametri AP x CC x LL), localizzata in corrispondenza della convessità fronto-parietale destra. La lesione è compatibile con meningioma cerebrale. Immagini post-operatorie del caso in a,b,c acquisite sui piani sagittale (d), assiale (e) e coronale (f) documentano la completa asportazione della lesione cerebrale.

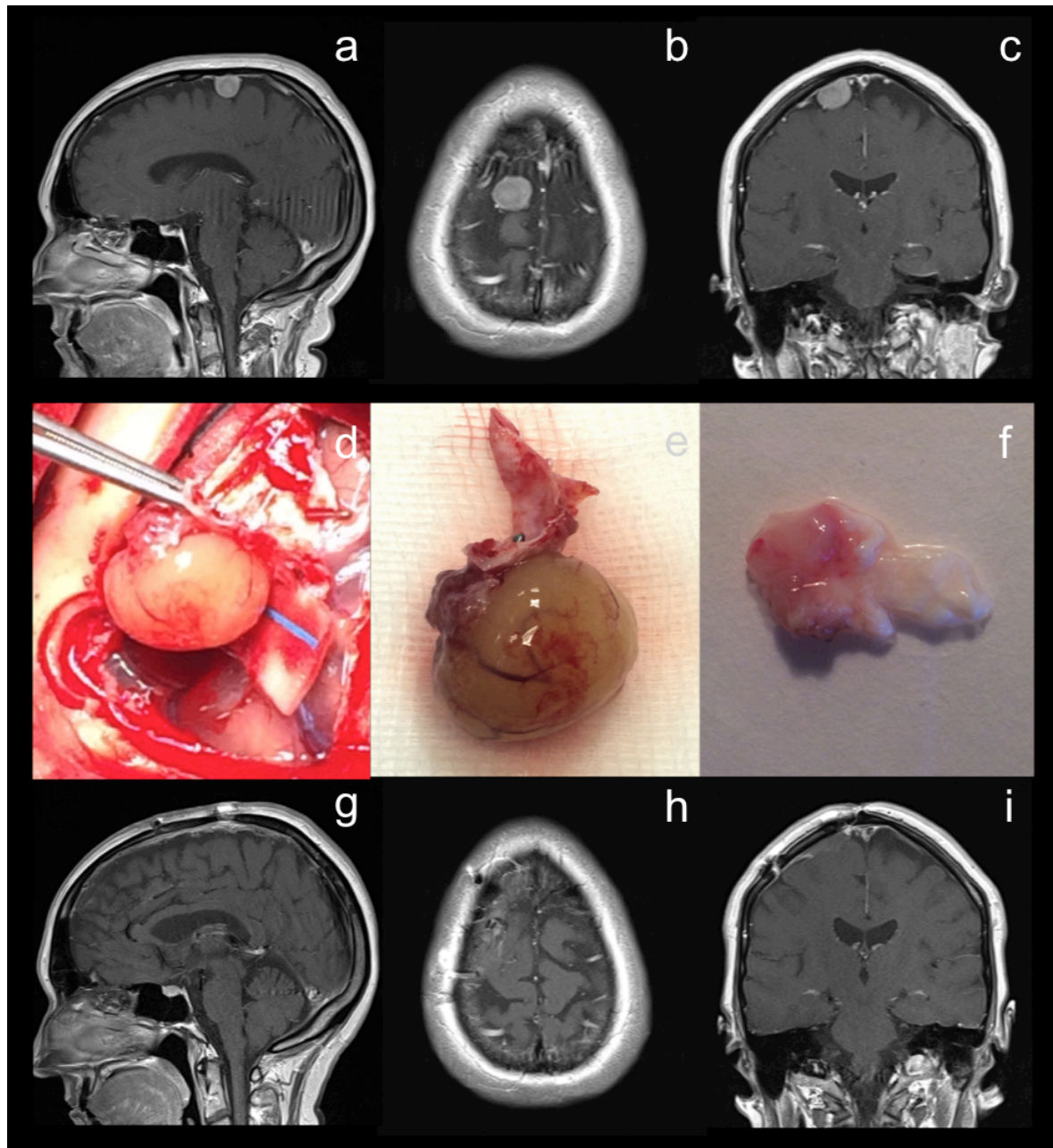


Fig. 5.3 Risonanza magnetica encefalo; sequenze pesate in T1 dopo somministrazione di gadolinio acquisite sui piani sagittale (a), assiale (b) e coronale (c) documentano la presenza di una formazione espansiva extrassiale a morfologia rotondeggiante, con potenziamento contrastografico intenso ed omogeneo, del diametro massimo di circa 18 mm, localizzata in corrispondenza della convessità frontale destra, con aderenza al piano meningeo. Tale lesione impronta la circonvoluzione frontale superiore omolaterale, senza determinare reazione edemigena intraparenchimale. I reperti sono da riferire alla presenza di meningioma della volta.

Immagini intraoperatorie del caso in a,b,c, che mostrano l'asportazione microchirurgica della lesione con la dura madre d'impianto (d), si noti la nicchia creata dal tumore che impronta il parenchima cerebrale senza invaderlo; meningioma asportato *en bloc* con la dura madre d'origine (e); campioni tissutali prelevati dalla lesione asportata, per le analisi AFM e anatomo-patologiche (f).

Risonanza post-operatoria del caso in a,b,c, acquisita sui piani sagittale (g), assiale (h) e coronale (i) dopo somministrazione di gadolinio, documenta la completa asportazione della lesione cerebrale.

5.3 Analisi AFM e correlati anatomo-patologici

5.3.1 Caratterizzazione nanomeccanica di tessuti di glioblastoma

L'analisi dei campioni tissutali di glioblastoma (GBM) ci ha permesso di identificare aree tumorali dal comportamento biomeccanico differente.

In Figura 5.4 mostriamo quattro mappe di modulo elastico di Young (E) rappresentative dei tessuti di GBM campionati nelle regioni più profonde (Fig. 5.4 a-d) e in quelle intermedie del tumore (Fig. 5.4 i-n). I valori di E sono rappresentati nelle mappe mediante falsi colori, secondo le scale riportate a sinistra. Risultati simili sono stati ottenuti per gli altri due pazienti con GBM. Ciascuna delle curve di indentazione è stata acquisita a un *rate* di indentazione di 5 $\mu\text{m/s}$ e una forza di indentazione di 5 nN . Le relative profondità di indentazione variano su un ampio intervallo di valori, da circa 100 nm a circa 600 nm, a seconda della *stiffness* locale. Per ricostruire il valore del modulo di Young E è stato effettuato un fit dell'eq. [6] alla curve di indentazione, come descritto in Materiali e Metodi.

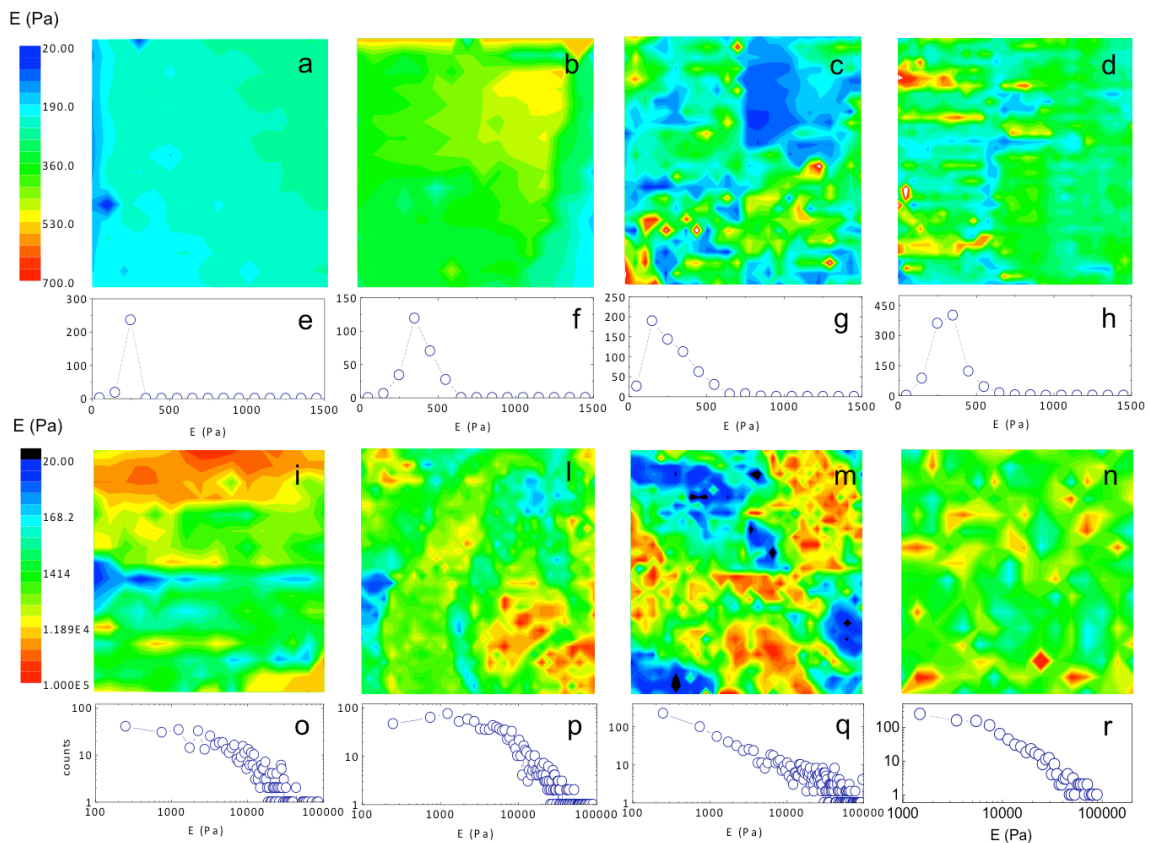


Fig. 5.4 a-h: Regioni necrotiche del glioblastoma. a-d: Mappe di modulo elastico di Young rappresentative dei tessuti di glioblastoma campionati nelle regioni più profonde. e-h: Istogrammi di frequenza del modulo di Young E calcolati per ciascuna delle mappe riportate sopra (a-d).

i-r: Core del glioblastoma. i-n: Mappe di modulo elastico di Young rappresentative dei tessuti di glioblastoma campionati nelle regioni intermedie. o-r: Istogrammi di frequenza del modulo di Young E calcolati per ciascuna delle mappe riportate sopra (i-n).

Le mappe mostrate in Figura 5.4 hanno dimensioni $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$, sono state cioè ottenute scansionando aree del campione di $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$; ogni pixel rappresenta il valore del modulo di Young calcolato tramite il fit Hertiziano della curva ottenuta in quel punto.

A questa scala i campioni di tessuto sono caratterizzati da una notevole rugosità, dell'ordine di diverse decine di micron (Fig. 4.2 d-f). L'acquisizione ininterrotta, a nostra conoscenza mai ottenuta in precedenza, di mappe di tale grandezza su superfici ad alta rugosità non sarebbe stata possibile senza l'utilizzo del piezo extra da 100 micron fornito dal modulo aggiuntivo *cellHesion* (si veda il capitolo Materiali e Metodi).

Le Figure 5.4 e-h e 5.4 o-r mostrano, per ciascuna delle mappe riportate sopra, l'istogramma di frequenza del modulo di Young apparente E calcolato.

Le regioni più profonde del GBM mostrano un comportamento biomeccanico specifico e correlano con aree di necrosi identificate all'esame istologico standard (Fig. 5.5 a). Le mappe relative a tali regioni necrotiche (Fig. 5.4 a-d) mostrano una distribuzione piuttosto omogenea, senza una chiara strutturazione spaziale, con valori che vanno da ~20 Pa a meno di 1000 Pa per tutti i campioni misurati; visto l'intervallo limitato, i dati sono mostrati in scala lineare.

I campioni prelevati dalle regioni intermedie del GBM mostrano un comportamento biomeccanico differente rispetto a quello delle aree necrotiche e caratteristico per tutti i campioni esaminati. I dati istologici standard confermano che questi campioni sono stati prelevati dal *core* del tumore (Fig. 5.6 a). Le mappe relative alle regioni del *core* tumorale (Fig. 5.4 i-n) mostrano una distribuzione di valori di E fortemente disomogenea, che spazia su quattro ordini di grandezza, da poche decine di Pa fino a raggiungere $\sim 10^5$ Pa. Dato l'intervallo di valori estremamente ampio, è stata utilizzata una scala logaritmica per una migliore visualizzazione dei dati.

Dunque, gli istogrammi di frequenza per la necrosi in GBM rivelano una distribuzione di valori del modulo di Young quasi unimodale, con un valore medio complessivo delle misure effettuate su tutti i campioni esaminati di 310 ± 50 Pa; nello specifico, per i dati mostrati, i valori medi sono 206 ± 8 Pa (Fig. 5.4 e), 275 ± 10 Pa (Fig. 5.4 f), 280 ± 140 (Fig. 5.4 g) e 320 ± 100 (Fig. 5.4 h). I valori sono espressi come media \pm deviazione standard.

Al contrario, le distribuzioni calcolate per le mappe in Figura 5.4 i-n sono fortemente asimmetriche, presentando una coda lunga che si estende a valori di E fino a 27 volte più grandi del valore medio complessivo che è risultato essere di 11100 ± 5500 Pa; nello specifico, per i dati mostrati, i valori medi sono 8100 ± 700 Pa (Fig. 5.4 o), 13200 ± 600 Pa (Fig. 5.4 p), 10300 ± 3900 (Fig. 5.4 q) e 9000 ± 400 (Fig. 5.4 r). Pertanto, è stata utilizzata una scala logaritmica sia per l'asse x sia per l'asse y, al fine di meglio visualizzare tale coda nelle distribuzioni.

Le mappe relative alle regioni del *core* tumorale (Fig. 5.4 i-n) forniscono un risultato sperimentale chiave: nel *core* del glioblastoma è possibile identificare sia strutture morbide, con bassa *stiffness* (20-1000 Pa), sia strutture rigide, caratterizzate da moduli di Young che variano da pochi kPa fino a 10^5 Pa. Questo risultato suggerisce che il *core* del tumore sia un tessuto dalla complessa organizzazione, costituito da molteplici strutture con risposte biomeccaniche differenti. Al contrario, nella necrosi non sono identificabili strutture diverse fra loro e, in particolare, non sono presenti le strutture caratterizzate da alti valori di E (Fig. 5.4 a-h). Questi dati indicano chiaramente una netta differenza nella risposta biomeccanica del *core* del tumore rispetto alle regioni necrotiche. Questo differente comportamento biomeccanico di zone centrali e di intermedia profondità del GBM è correlabile alle profonde modificazioni che avvengono nel microambiente tumorale durante lo sviluppo e la diffusione del tumore stesso.

Come abbiamo visto, i livelli di proteine fibrose, quali collagene, fibronectina, laminina, sono inferiori nel cervello normale rispetto a quelle del tessuto connettivo al di fuori del sistema nervoso centrale.^{29,101} A differenza di tali tessuti, il parenchima cerebrale sano è composto principalmente da acido ialuronico, che gli conferisce la necessaria e specifica rigidità meccanica. Le cellule di glioblastoma producono costitutivamente acido ialuronico, la cui produzione aumenta durante la proliferazione cellulare, favorendo l'invasione neoplastica. Ne risulta un livello quattro volte superiore del contenuto in acido ialuronico nel GBM rispetto al cervello sano (Fig. 5.8).^{29,129} Questa sovra-espressione dell'acido ialuronico (Fig. 5.8 b)

potrebbe essere responsabile dei contributi elastici nell'intervallo fra qualche kPa e poche decine di kPa osservati in Figura 5.4 i-r, coerentemente con i valori di *stiffness* dell'acido ialuronico nel sistema nervoso centrale precedentemente osservati in letteratura.^{304,305}

In aggiunta, le cellule di glioma sono note promuovere l'angiogenesi, al fine di favorire la diffusione e la migrazione delle cellule tumorali. La membrana basale vascolare fornisce la principale via di disseminazione per il glioma: la sua rigidità intrinseca, dovuta alla presenza di proteine fibrose, aumenta la velocità di migrazione delle cellule.³⁰⁵ Molte fra queste proteine, come la fibronectina e la laminina, normalmente limitate al distretto vascolare e perivascolare nel cervello sano, vengono espresse dai gliomi fortemente aggressivi.^{54,149} Queste molecole fibrose altamente resistenti, tanto quelle che costituiscono le strutture vascolari e perivascolari quanto quelle che appartengono allo stroma extra-vascolare, sono probabilmente fra le principali responsabili dei valori più alti negli istogrammi di frequenza del modulo di Young nelle Figure 5.4 o-r, essendo compatibili con valori di modulo di Young di diverse decine di kPa.

La sovra-espressione delle molecole della matrice extra-cellulare e la loro interazione con le cellule neoplastiche mediata da recettori giocano un ruolo chiave nel processo di invasione tumorale. Infatti, quando perdono contatto con la massa tumorale primaria, le cellule neoplastiche si allungano estendendo il loro margine anteriore il quale si fissa al substrato della matrice extra-cellulare attraverso molecole di adesione (principalmente le integrine). Questo stadio è cruciale per generare la trazione e le forze necessarie per il movimento delle cellule di glioma. Successivamente, l'interazione con le molecole della matrice extra-cellulare diventa un ostacolo per ulteriori spostamenti delle cellule. Ciò porta al reclutamento di proteasi di superficie, appartenenti prevalentemente alla famiglia delle metalloproteasi (MMP), capaci di degradare le componenti della matrice extra-cellulare, consentendo così la migrazione cellulare all'interno di spazi di nuova creazione.²⁹

Le regioni necrotiche (Fig. 5.4 a-d) sono caratterizzate da un'aumentata espressione delle MMP.^{29,306,307} La sovra-espressione di queste molecole nella necrosi è in chiaro accordo con la tipica forma della distribuzione del modulo di Young mostrata nelle Figure 5.4 e-h, in cui la componente a valori molto grandi di *E* non è più osservabile.

Inoltre, i tumori necrotici presentano un'aumentata attività delle ialuronidasi rispetto ai tessuti non necrotici. La digestione dell'acido ialuronico tipica delle aree di necrosi spiega l'assenza osservata nelle regioni necrotiche del glioblastoma (Fig. 5.4 e-h), di strutture caratterizzate da valori di *E* nell'intervallo ~1 - ~30 KPa. Il picco singolo centrato intorno a poche centinaia di Pa può essere così attribuito alla presenza di cellule neoplastiche e di tessuto necrotico, come confermato dall'analisi istologica riportata in Figura 5.5 a. Le analisi istologiche riportate in Figura 5.5 e 5.6 sostengono i riscontri AFM, in particolare la colorazione di Gomori mostra una scarsa presenza di fibre reticolari nella regione necrotica (Fig. 5.5 b); al contrario nel *core* tumorale sono apprezzabili numerose proteine fibrose disposte a circondare i vasi neoformati (Fig. 5.6 b).

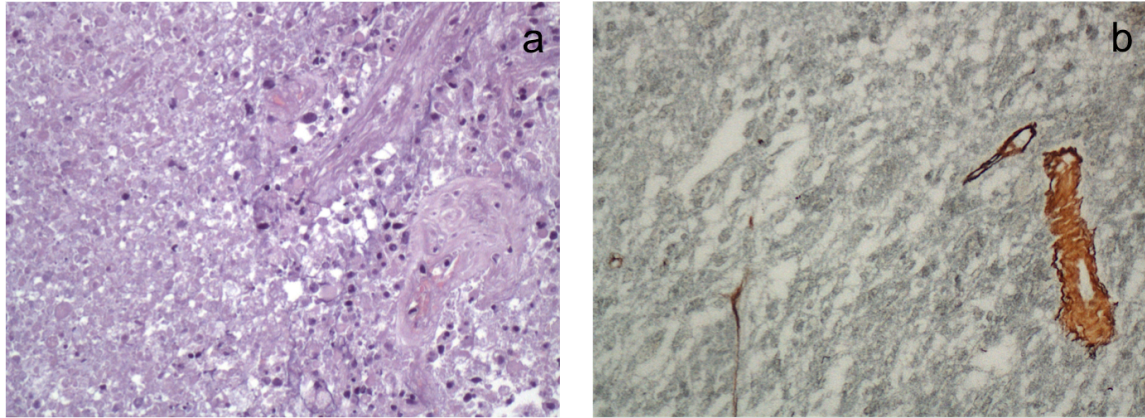


Fig. 5.5 Necrosi in glioblastoma. a: Colorazione con ematossilina-eosina. Area diffusa di necrosi in un glioblastoma. b: Colorazione di Gomori. Rare fibre reticolari identificabili attorno ad un solo vaso sanguigno.

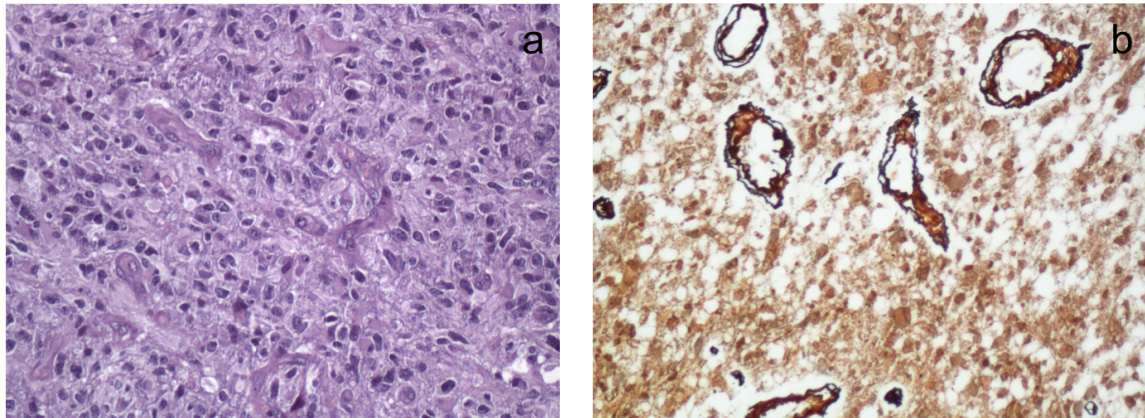


Fig. 5.6 *Core* tumorale del glioblastoma. a: Colorazione con ematossilina-eosina. Cellule pleomorfe in un glioblastoma con nuclei anaplastici, mitosi e proliferazione vascolare. b: Colorazione di Gomori. Glioblastoma con fibre connettivali reticolari disposte intorno ai vasi sanguigni.

5.3.2 Alla ricerca del margine tumorale: caratterizzazione nanomeccanica della sostanza bianca

In tre dei pazienti con glioblastoma sono state asportate *en bloc* voluminose lesioni cerebrali (Fig. 5.7 a).

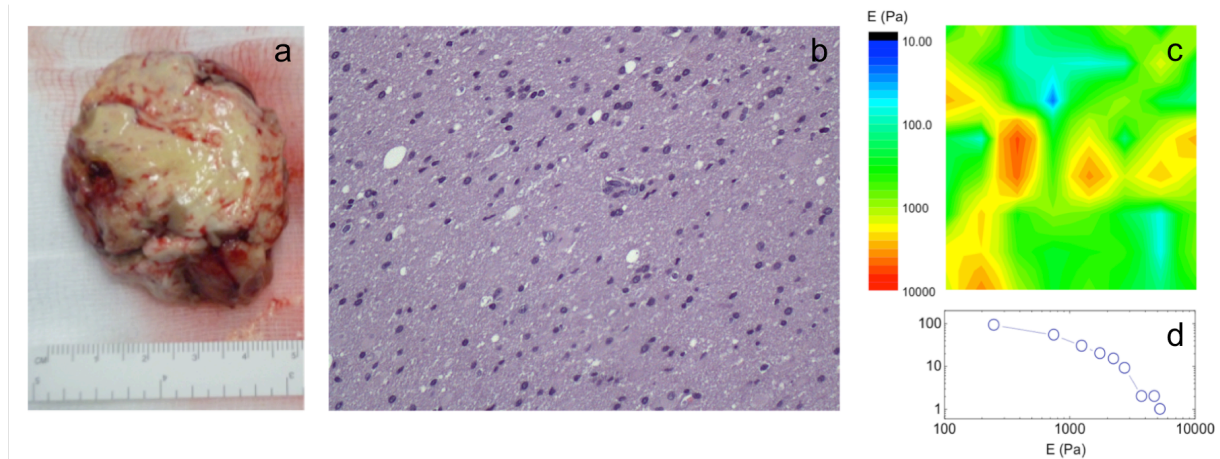


Fig. 5.7 a: Aspetto macroscopico di una voluminosa lesione gliale asportata *en bloc*, delle dimensioni di circa $4,5 \times 4 \times 2,5$ cm. b: Colorazione istologica con ematossilina-eosina di un campione di sostanza bianca encefalica analizzata dalla superficie del pezzo operatorio descritto in a. La sezione mostra materia cerebrale normale con oligodendrociti e astrociti immersi in un parenchima ricco di neuropilo. c: Mappa del modulo di Young del campione di sostanza bianca. d: Istogramma della distribuzione di frequenza dei valori del modulo elastico riportati nella mappa in c.

L'individuazione del margine del tumore è un problema aperto in chirurgia ed è particolarmente rilevante nel caso del GBM, a causa del pattern di infiltrazione peculiare delle cellule neoplastiche di quest'ultimo. L'esame istologico dei campioni tissutali prelevati in periferia, all'interfaccia tumore-parenchima sano, ha evidenziato la presenza di sostanza bianca sana (Fig. 5.7 b), come apprezzabile già all'ispezione macroscopica dei pezzi operatori (Fig. 5.7 a). Sezioni di tessuto prelevate da queste regioni sono state sottoposte ad analisi di indentazione AFM. La Figura 5.7 c mostra una mappa del modulo di Young rappresentativa dei tessuti di sostanza bianca esaminati. Il modulo elastico E assume valori compresi fra poche decine di Pa e ~ 6 kPa, con un valore medio di circa 1060 ± 610 Pa (media \pm deviazione standard della media) (Fig. 5.7 c-d); risultati compatibili sono stati ottenuti anche per gli altri due campioni. Tale valore è coerente con il valore atteso per la sostanza bianca normale il cui modulo di Young è noto essere compreso nell'intervallo fra ~ 1 kPa e 2 kPa.³⁰⁸⁻³¹⁰ Ne risulta che la materia bianca normale è significativamente più morbida rispetto ai tessuti campionati dal *core* tumorale, ma più rigida rispetto alla regione necrotica. In accordo con queste misure quantitative, è esperienza comune per il neurochirurgo che il *core* del tumore risulti più duro rispetto al parenchima circostante.

La Figura 5.7 d mostra la distribuzione di frequenza dei valori di E riportati nella mappa in Figura 5.7 c. A differenza delle regioni necrotiche, il tessuto sano non mostra un picco singolo e ben definito. Al contrario, si osserva un'ampia gamma di risposte elastiche che riflette la complessa organizzazione del tessuto esaminato. Tuttavia si nota anche l'assenza di strutture rigide tipicamente associate alle componenti vascolari e perivascolari e, più in generale, alla sovra-espressione delle proteine fibrose, tipica della condizione tumorale. Questi risultati sono confermati dall'esame istologico che mostra la presenza di cellule quali oligodendrociti e astrociti immersi in un parenchima ricco di neuropilo con scarsa rappresentazione di vasi (Fig. 5.7 b).

Un dato interessante emerge dalle colorazioni istochimiche con Alcian-blu dei campioni, le quali consentono di mettere in evidenza la presenza di acido ialuronico (Fig. 5.8). I preparati

istochimici mostrano una minore espressione di acido ialuronico nella sostanza bianca dell'encefalo (Fig. 5.8 a) rispetto a quella riscontrata nel *core* tumorale (Fig. 5.8 b).

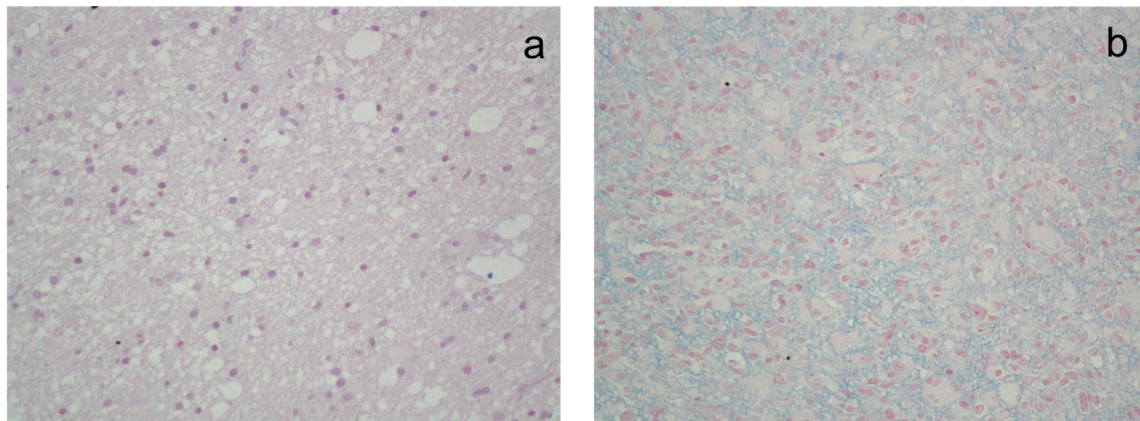


Fig. 5.8 Colorazione istochimica con Alcian-blu. a: Sostanza bianca encefalica. b: Presenza diffusa di mucine (glicosaminoglicano acido ialuronico) all'interno di un glioblastoma.

Questi risultati sono coerenti con l'assenza di strutture che rispondono nell'intervallo compreso fra 10 kPa e 35 kPa, che potrebbero essere associate alla sovra-espressione di acido ialuronico nella matrice extra-cellulare del glioblastoma.

5.3.3 Caratterizzazione nanomeccanica dell'ascesso cerebrale

L'ascesso cerebrale si è presentato come una struttura rotondeggiante, capsulata, a contenuto purulento. Sono stati esaminati campioni tissutali prelevati dalla capsula del focolaio suppurativo, tralasciando la quota fluido-mucosa localizzata all'interno della lesione in considerazione della sua consistenza di difficile analisi tramite AFM, se non per studi cellulari.

La caratterizzazione tissutale della risposta biomeccanica della capsula di un ascesso batterico cerebrale non è presente, ad oggi, in letteratura; tuttavia, essa potrebbe fornire un valido supporto per lo sviluppo di uno strumentario microchirurgico *ad hoc*, mirato ad impedire la disseminazione del contenuto purulento all'esterno della capsula con conseguente diffusione del processo infettivo nel parenchima encefalico, e a discriminare con maggiore sicurezza la capsula dell'ascesso dalla materia bianca circostante, al fine di garantire una più sicura dissezione chirurgica e un avanzamento in termini sia di pratica neurochirurgica sia di risultati clinici.

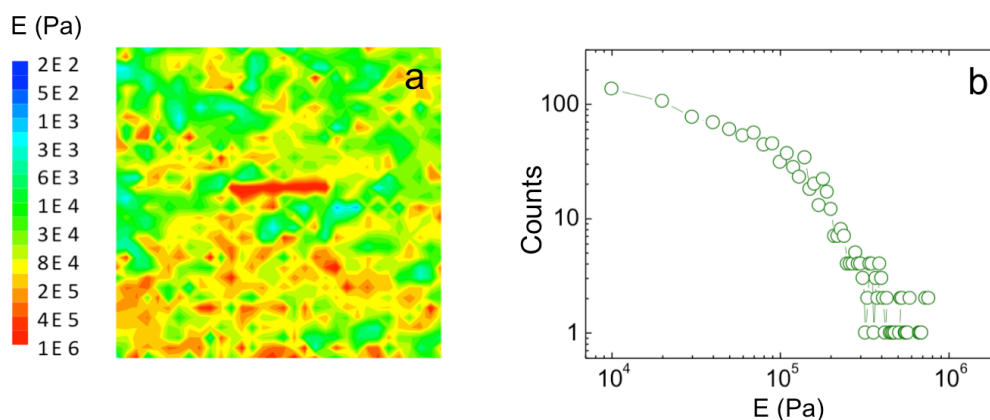


Fig. 5.9 Ascesso cerebrale a: Mappa di modulo di Young acquisita mediante IT-AFM sul versante esterno di un tessuto di capsula di ascesso cerebrale. I valori di E sono rappresentati nella mappa mediante falsi colori, secondo la scala riportata a sinistra. b: Istogramma di frequenza dei moduli di Young relativi alla mappa in a; i dati sono rappresentati utilizzando una scala doppio logaritmica.

In Figura 5.9 a è mostrata una mappa di modulo di Young acquisita mediante indentazione AFM sul versante esterno di un tessuto di capsula di ascesso cerebrale. È possibile notare che, in media, la capsula dell'ascesso presenta una struttura caratterizzata da un'elevata rigidità meccanica. I valori di E sono infatti compresi nell'intervallo tra alcune centinaia di Pa arrivando fino a valori estremamente elevati dell'ordine del MPa.

In Figura 5.9 b viene riportato l'istogramma di frequenza dei moduli di Young relativi alla mappa in Figura 5.9 a. L'istogramma mostra un andamento altamente asimmetrico caratterizzato da una coda ad alti valori del modulo di Young. Da un'analisi quantitativa dell'istogramma di frequenza è possibile stimare un valore medio di modulo di Young di ~ 110 kPa. Tale valore è estremamente elevato se confrontato con quello caratteristico per la sostanza bianca normale che, come abbiamo visto, è compreso tra 1 kPa e 2 kPa. Tale marcata differenza nelle risposte elastiche della capsula dell'ascesso batterico cerebrale e della sostanza bianca potrebbe essere alla base dello sviluppo di future applicazioni chirurgiche.

5.3.4 Ruolo delle forze viscoelastiche nel comportamento biomeccanico del glioblastoma

La maggior parte degli studi tramite AFM sulla biomeccanica dei tessuti tumorali ha trascurato il ruolo delle forze dissipative e l'influenza della dinamica di indentazione sul modulo di Young. Tuttavia, le forze dissipative e viscosi sono di grande interesse ai fini di una descrizione e comprensione approfondita del tessuto di GBM, in quanto governano la risposta biomeccanica delle proteine interstiziali, come i proteoglicani e l'acido ialuronico. Per valutare il ruolo di tali forze, abbiamo acquisito mappe 8×8 Pixel di modulo di Young, a diversi *rate* di indentazione nell'intervallo compreso fra $1 \mu\text{m/s}$ e $25 \mu\text{m/s}$, sia dalle regioni necrotiche sia dal *core* del tumore.

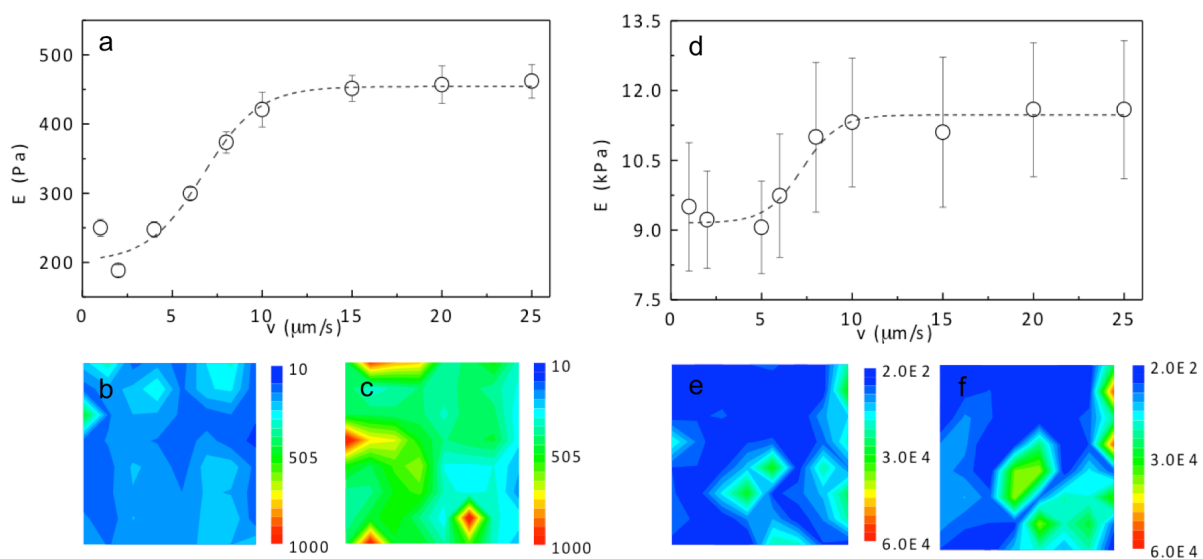


Fig: 5.10 a-c: Regioni necrotiche di glioblastoma. a: Grafico del valore medio del modulo elastico di Young (E) per mappe della regione necrotica acquisite a diversi *rate* di indentazione (v) nell'intervallo compreso fra $1 \mu\text{m/s}$ e $25 \mu\text{m/s}$. b,c: Mappe di E per un campione della regione necrotica acquisite al *rate* di indentazione rispettivamente di $1 \mu\text{m/s}$ e di $25 \mu\text{m/s}$. d-f: *Core* del glioblastoma. d: Grafico del valore medio del modulo elastico di Young (E) per mappe della regione del *core* tumorale acquisite a diversi *rate* di indentazione (v) nell'intervallo compreso fra $1 \mu\text{m/s}$ e $25 \mu\text{m/s}$. e,f: Mappe di E per un campione del *core* tumorale acquisite al *rate* di indentazione rispettivamente di $1 \mu\text{m/s}$ e di $25 \mu\text{m/s}$.

In Figura 5.10 a è riportato il valore medio di E calcolato per ciascuna mappa in funzione del *rate* di indentazione per le regioni necrotiche. Le barre d'errore indicano la deviazione standard della media. All'aumentare del *rate* di indentazione, i valori di E crescono

monotonamente, raggiungendo un plateau a una frequenza di indentazione di circa $15 \mu\text{m/s}$. Questo dato conferma che la necrosi non si comporta come un corpo perfettamente elastico e che le forze dissipative viscosse giocano un ruolo importante nel determinare la sua risposta meccanica. In Figura 5.10 b-c sono riportate due mappe rappresentative acquisite al *rate* di indentazione rispettivamente più basso ($1 \mu\text{m/s}$) e più alto ($25 \mu\text{m/s}$). È stata scelta una risoluzione spaziale di circa 500 nm per prevenire una deriva apprezzabile dei campioni durante l'analisi, che si verifica specialmente a *rate* di indentazione più bassi, che richiedono tempi di acquisizione più lunghi. La stessa scala di colori è stata utilizzata per entrambe le mappe. Si può notare come la mappa a $25 \mu\text{m/s}$ sia uniformemente più chiara di quella a $1 \mu\text{m/s}$. Questo risultato suggerisce che la risposta viscoelastica per il tessuto necrotico è omogenea, coerentemente con la sua composizione costituita principalmente da cellule morte, detriti cellulari e prodotti di degradazione.

In Figura 5.10 d il valore medio di E calcolato per ciascuna mappa è mostrato in funzione del *rate* di indentazione per il *core* tumorale. Le Figure 5.10 e-f mostrano due mappe rappresentative della stessa regione acquisite a *rate* di indentazione, rispettivamente, di $1 \mu\text{m/s}$ e di $25 \mu\text{m/s}$. Anche in questo caso si osserva una crescita monotona fino al raggiungimento di un plateau a un *rate* di indentazione di $\sim 10 \mu\text{m/s}$, a riprova di un comportamento viscoelastico anche per le regioni del *core* tumorale. Tale comportamento è compatibile con la sovra-espressione dell'acido ialuronico in questa regione. Le deviazioni standard sono sensibilmente più grandi in Figura 5.10 d rispetto alla Figura 5.10 a, quale ulteriore conferma di una maggiore complessità strutturale del *core* del tumore rispetto alle aree di necrosi. Si noti come, in questo caso, l'incremento percentuale di E sia largamente inferiore (25% circa) rispetto a quello osservato per la regione necrotica (circa 125%) e non si osserva, al *rate* di indentazione massimo ($25 \mu\text{m/s}$), un incremento spazialmente omogeneo del valore di E . Al contrario, notiamo come alcune regioni presentino incrementi maggiori e altre minori. Tale risposta disomogenea è probabilmente dovuta alla complessa struttura del *core* del glioblastoma, composta tanto di elementi dalla risposta tipicamente viscoelastica, quali l'acido ialuronico, quanto da elementi dalla risposta tipicamente elastica, come la vascolarizzazione, ricca di proteine fibrose associate (Fig. 5.8 b, Fig. 5.6 b).

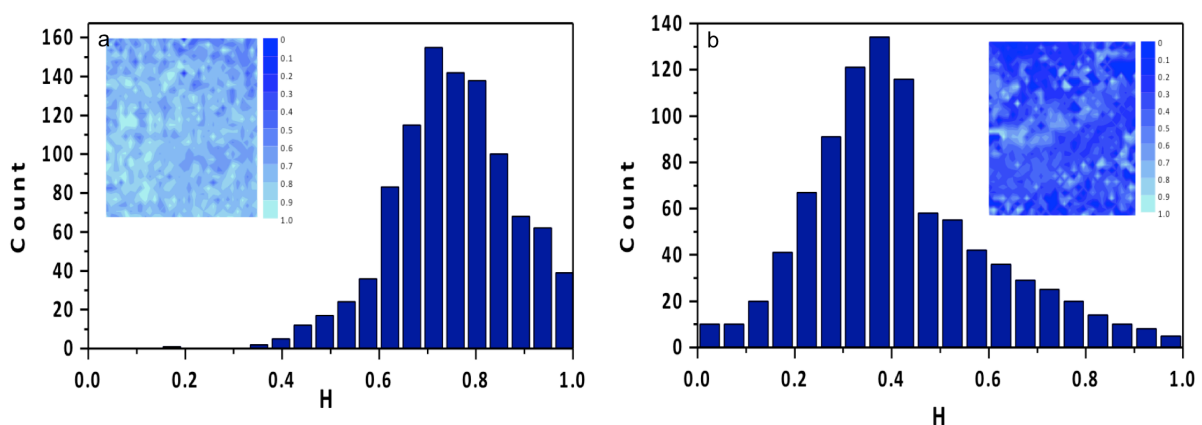


Fig. 5.11 a: Mappa di isteresi (inserto in alto a sinistra) e corrispondente istogramma di frequenza per la necrosi del tumore. b: Mappa di isteresi (inserto in alto a destra) e corrispondente istogramma di frequenza per il *core* del glioblastoma.

Per valutare quantitativamente il contributo delle forze dissipative è stata stimata l'energia dissipata durante il processo di deformazione (o isteresi H), come discusso in Materiali e Metodi. La Figura 5.11 a mostra la mappa di isteresi (inserto in alto a sinistra) e il corrispondente istogramma di frequenza per la necrosi del tumore; la Figura 5.11 b mostra invece i risultati omologhi per il *core* del tumore. Si può notare come la mappa di H per la

necrosi del tumore sia più chiara e più omogenea rispetto a quella del *core* tumorale. Tale risultato è confermato quantitativamente dai due istogrammi. È possibile notare che l'istogramma di frequenze relativo al tessuto necrotico (Fig. 5.11 a) presenta un picco ben definito centrato intorno ad un valore di H di circa 0.8, mentre l'istogramma del *core* tumorale (Fig. 5.11 b) presenta un picco ben definito a valori di H intorno a 0.4. In altri termini gli istogrammi indicano che circa l'80% dell'energia utilizzata per indentare il campione è stata dissipata durante l'indentazione del tessuto necrotico; una percentuale nettamente inferiore, circa il 40%, è stata invece dissipata durante l'indentazione del *core* tumorale. Tale riduzione significativa della percentuale di energia dissipata è perfettamente in accordo con quanto discusso precedentemente, cioè che nel *core* tumorale sono presenti sia strutture caratterizzate da una risposta meccanica viscoelastica sia strutture caratterizzate da una risposta puramente elastica. Queste ultime componenti sono invece assenti nel tessuto necrotico del glioblastoma che mostra un comportamento prevalentemente viscoso.

È stata eseguita la stessa quantificazione per i campioni di tessuto cerebrale sano. In Figura 5.12 è raffigurata una mappa di isteresi rappresentativa della sostanza bianca (inserto in alto a sinistra) e la relativa distribuzione di frequenza dei valori di H calcolati. È interessante notare come l'isteresi della sostanza bianca encefalica sia caratterizzata da un picco ben definito centrato su un valore medio di 0.55 ± 0.09 (media \pm deviazione standard della media) (Fig. 5.12, istogramma); questo valore è intermedio tra quelli ottenuti per la necrosi e per il *core* tumorale. Ciò è coerente con la presenza nel tessuto sano, rispetto alla necrosi, di elementi strutturali a comportamento sia viscoelastico sia puramente elastico.

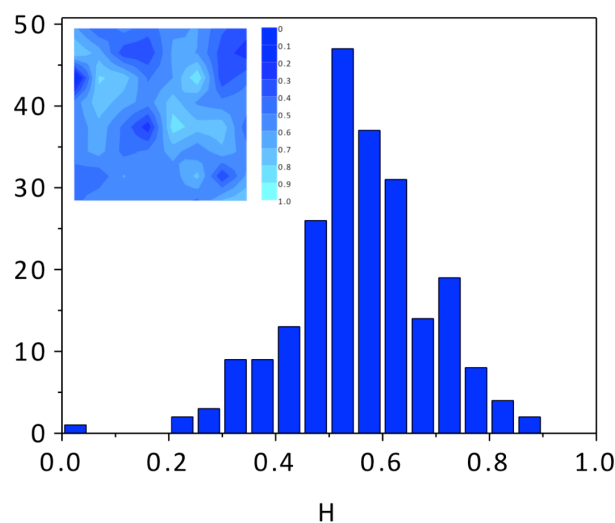


Fig. 5.12 Mappa di isteresi rappresentativa per la sostanza bianca (inserto in alto a sinistra) e corrispondente istogramma di frequenza dei valori di H calcolati.

5.3.5 Caratterizzazione nanomeccanica di tessuti di meningioma

La Figura 5.13 a,b mostra due mappe rappresentative di modulo di Young acquisite analizzando campioni di meningioma meningoteliali, come confermato dall'analisi istologica (Fig. 5.14); in Figura 5.13 c è riportata una mappa rappresentativa di dura madre in sede di infiltrazione da parte di cellule di meningioma, secondo il riscontro istologico riportato in Figura 5.15 a.

I valori di modulo di Young sono rappresentati nelle mappe mediante falsi colori, secondo la scala riportata a destra, uguale per tutte e tre le mappe.

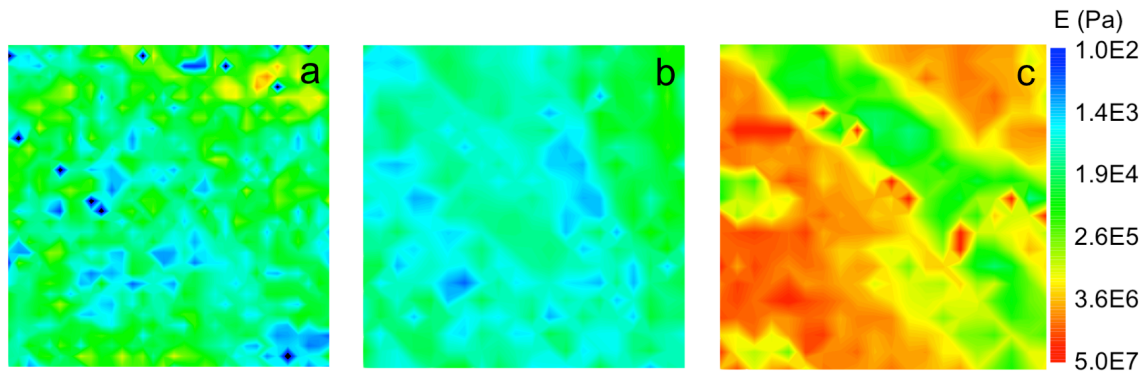


Fig. 5.13 a,b: Mappe di modulo elastico di Young rappresentative dei tessuti di meningioma meningoteliale. b: Mappa relativa ad un tessuto di meningioma meningoteliale campionato in una regione con scarse formazioni vorticose. c: Mappa di modulo elastico di Young rappresentativa di dura madre in sede di infiltrazione da parte di cellule di meningioma, acquisita su un campione tissutale di dura madre d'impianto adesa al meningioma.

È possibile notare che il modulo di Young per i campioni di meningioma (Fig. 5.13 a,b) è compreso nell'intervallo tra ~ 100 Pa e $\sim 2 \times 10^5$ Pa. Questo intervallo di valori mostra, come atteso dall'esperienza nella pratica chirurgica, che il meningioma presenta una maggiore rigidità meccanica rispetto al glioblastoma, sia relativamente al *core* sia alla necrosi di GBM. Inoltre, i meningiomi mostrano una maggiore rigidità anche rispetto ai campioni di sostanza bianca sana che, come abbiamo visto, presenta valori di modulo di Young compresi nell'intervallo tra 100 Pa e 6000 Pa. Pertanto risulta evidente che i meningiomi presentano una *stiffness* di oltre un ordine di grandezza maggiore rispetto a quella della sostanza bianca cerebrale. Anche questo riscontro è in accordo con i risultati attesi e con l'esperienza chirurgica, nonché con il meccanismo di crescita ed espansione del meningioma, caratterizzato da una compressione del parenchima cerebrale circostante senza che vi sia infiltrazione della materia sana. Questa rigidità del tessuto può essere attribuita alla produzione da parte delle stesse cellule di meningioma di proteine fibrose quali collagene e fibronectina; tale comportamento è in accordo con l'origine mesenchimale del meningioma da cui deriva la funzione simil-fibroblastica delle cellule tumorali.

Per quanto concerne il campione di dura madre infiltrata (Fig. 5.13 c), è possibile osservare una distribuzione dei valori di modulo di Young (E) nell'intervallo compreso tra $\sim 1 \times 10^4$ Pa e 5×10^7 Pa. Questo risultato mostra che la dura infiltrata è caratterizzata da una maggiore rigidità rispetto al tumore. Tale comportamento è in accordo con la natura connettivale del tessuto durale (Fig. 5.15 b). Osservando la mappa, è inoltre possibile identificare due regioni differenti ben delineate e chiaramente distinguibili che mostrano una risposta elastica significativamente differente: una regione più rigida, con una distribuzione di E compresa tra 3×10^6 Pa e 5×10^7 Pa (zona rossa nella mappa, Fig. 5.13 c) e un regione più morbida con valori di modulo di Young compresi nell'intervallo tra 1×10^4 Pa e 2×10^5 Pa (zona verde, Fig. 5.13 c). La zona rossa ad elevata rigidità meccanica può essere associata a tessuto durale

5. Risultati

prevalentemente non infiltrato, presentando valori di modulo di Young comparabili con quelli noti per le fibre collagene. A conferma dell'elevata rigidità riscontrata, la colorazione di Gomori mette in risalto un'alta espressione di proteine fibrose nel tessuto durale (Fig. 5.15 b). Al contrario, l'area verde caratterizzata da una minore rigidità (Fig. 5.13 c) presenta un comportamento meccanico simile a quello del tessuto meningiomatoso (Fig. 5.13 a,b); ciò è apprezzabile visivamente osservando le mappe grazie all'utilizzo della stessa scala di colori per tutte e tre: sia i tessuti di meningioma sia la regione durale investigata sono rappresentate con lo stesso intervallo di colori (verde, Fig. 5.13 a-c). Questo risultato suggerisce, come confermato dall'analisi istologica, che tale regione possa essere la sede di transizione dura sana/dura infiltrata, ove è quindi possibile identificare una sorta di "fronte di infiltrazione" di cellule tumorali di meningioma all'interno della dura madre (Fig. 5.15 a).

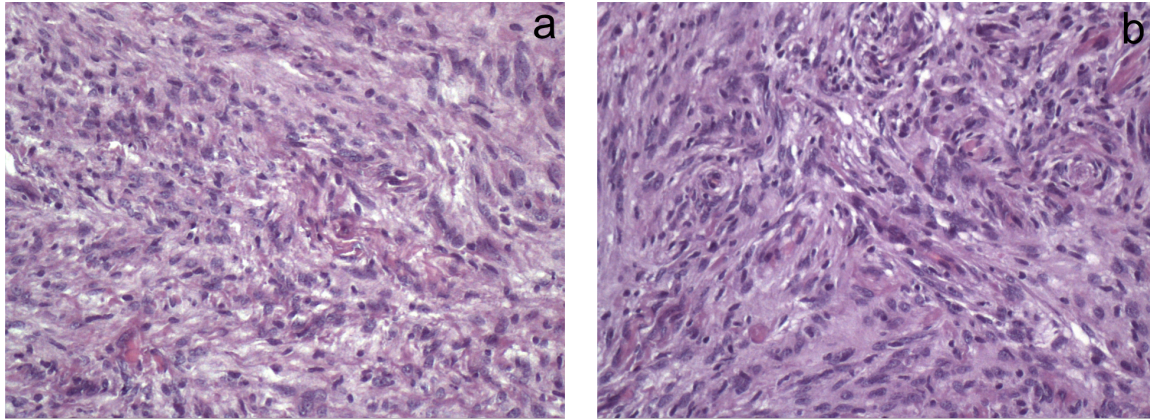


Fig. 5.14 a,b: Colorazione con ematossilina-eosina. Meningioma meningoteliale costituito da cellule con nuclei allungati. b: Cellule di meningioma allungate disposte a formare scarsi vortici.

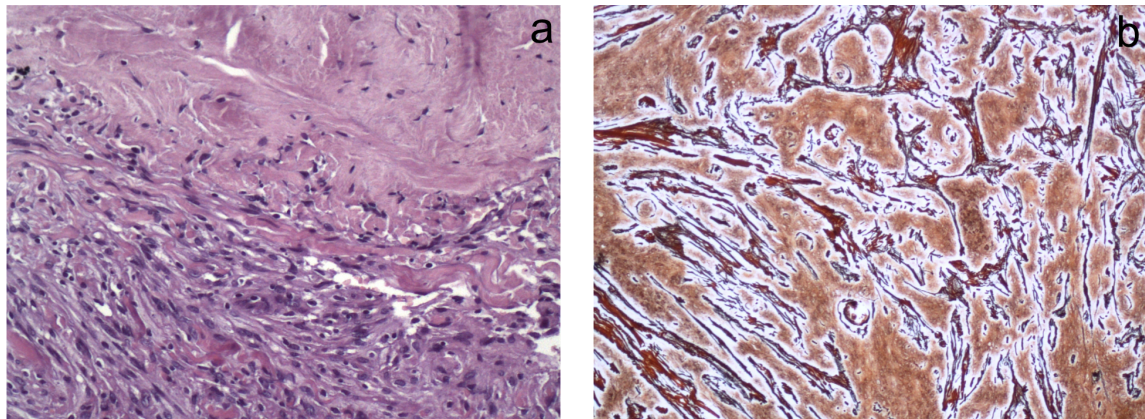


Fig. 5.15 Dura madre infiltrata da cellule di meningioma. a: Colorazione con ematossilina-eosina. Cellule di meningioma (i cui nuclei sono colorati in blu-violetto) si infiltrano nella trama connettivale della dura madre (rosa). b: Colorazione di Gomori. Cellule di meningioma infiltrano diffusamente la dura madre con ampie aree di reticoli fibrosi, in accordo con la natura connettivale della dura madre stessa.

In Figura 5.16 sono riportate le distribuzioni di frequenza dei valori di modulo di Young (E) relative ai campioni di meningioma esaminati (curve 1,2,3,4) e ai tessuti di dura madre infiltrata (curve 5,6), come confermato dalle analisi istologiche (Fig. 5.14, Fig. 5.15 a).

In accordo con quanto osservato dall'analisi delle mappe in Figura 5.13, appare evidente che le regioni di dura infiltrata (curve 5,6) presentano una *stiffness* maggiore rispetto ai meningiomi (curve 1-4). È possibile osservare che gli istogrammi relativi al tessuto di dura infiltrata hanno un picco centrato intorno a 6×10^6 Pa. Inoltre, queste distribuzioni sono

altamente asimmetriche e mostrano una pronunciata coda a bassi valori di E . Entrambe le code occupano lo stesso intervallo di modulo di Young dei meningiomi, evidenziabile con l'elevata sovrapposizione grafica delle code (curve 5,6) e delle distribuzioni dei meningiomi (curve 1-4).

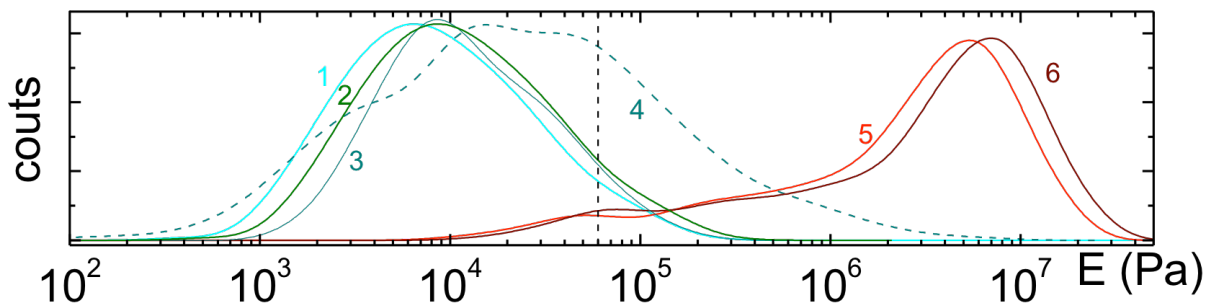


Fig. 5.16 Distribuzione di frequenza del modulo di Young per i campioni tissutali di meningioma (curve 1,2,3,4) e di dura infiltrata (curve 5,6) esaminati.

Le distribuzioni di frequenza del modulo di Young dei campioni di meningioma esaminati mostrano un comportamento simile fra loro, fatta eccezione per la curva 4.

Le curve 1,2,3 mostrano una distribuzione di valori di E unimodale, con picco intorno a 10^4 Pa e una leggera spalla intorno a $\sim 2 \times 10^4$ Pa. La curva 4 mostra la presenza di tre massimi locali distinti, centrati rispettivamente a 10^4 Pa, 2×10^4 Pa e a $\sim 6 \times 10^4$ Pa. Da un'analisi comparativa delle curve 1,2,3 e 4 è possibile identificare un pattern caratteristico della risposta biomeccanica del meningioma caratterizzato dalla presenza di strutture con una risposta meccanica tipica, centrata intorno a 10^4 Pa e 2×10^4 Pa. La curva 4, in aggiunta a queste due componenti, mostra anche una terza componente centrata in $\sim 6 \times 10^4$ Pa, non presente nelle altre curve. La differenza tra il comportamento biomeccanico del meningioma rappresentato dalla curva 4 e gli altri meningiomi investigati può essere interpretata e compresa alla luce dei risultati anatomo-patologici (Fig. 5.14). Confrontando le misure AFM dei campioni tissutali di meningioma esaminati con le rispettive analisi istologiche, emerge che le curve 1,2,3,4 corrispondono tutte a meningiomi meningoteliali di Grado I secondo WHO, di cui è stato identificato un pattern comune caratteristico; tuttavia la curva 4 appartiene ad un meningioma caratterizzato dalla presenza alcuni di vortici (Fig. 5.14 b), non rilevabili negli altri campioni tissutali esaminati (Fig. 5.14 a). I vortici sono costituiti istologicamente da cellule meningoteliali allungate e componenti fibrose che si dispongono concentricamente a costituire e circondare i vortici stessi (Fig. 5.14 b, Fig. 5.17 a). Pertanto, appare evidente che la regione dei vortici possa sovra-esprimere proteine fibrose (Fig. 5.17 b) rispetto alle aree circostanti prive di vortici costituite da fibre connettivali, suggerendo un comportamento meccanico caratterizzato da una maggiore rigidità rispetto ai meningiomi senza tali vortici. Le conferme ottenute grazie al confronto con i risultati anatomo-patologici suggeriscono che il terzo picco di elevata rigidità centrato intorno a 6×10^4 Pa della curva 4 possa essere attribuito alla presenza di vortici.

La differenza tra il comportamento meccanico dei meningiomi meningoteliali con e senza vortici è apprezzabile in maniera efficace dall'analisi delle distribuzioni di frequenza piuttosto che dalle mappe di modulo di Young. La mappa di modulo elastico di Young in Figura 5.13 b è relativa alla curva 4 dell'istogramma in Figura 5.16. Sebbene sia possibile notare una struttura dalla conformazione semicircolare ben definita nella mappa relativa al tessuto con vortici (Fig. 5.13 b, angolo in alto a destra), le mappe dei meningiomi a, b (Fig. 5.13) appaiono del tutto simili tra loro. Ciò è da attribuire al fatto che entrambe le mappe sono state rappresentate utilizzando la stessa scala utilizzata per la rappresentazione della mappa del tessuto durale infiltrato (Fig. 5.13 c) che comprende un intervallo di valori di modulo elastico

di oltre due ordini di grandezza maggiore rispetto all'intervallo necessario per rappresentare le mappe del tessuto di meningioma. L'utilizzo di tale scala consente di mettere bene in evidenza le differenze di *stiffness* tra tessuto di meningioma e tessuto durale, ma non consente di osservare differenze apprezzabili fra i meningiomi meningoteliali con e senza vortici; differenze chiaramente apprezzabili dall'analisi delle curve dei meningiomi nell'istogramma di frequenza (Fig. 5.16).

5.3.5.1 Risposta biomeccanica dei vortici

Al fine di confermare che il picco osservato intorno a 6×10^4 Pa possa essere attribuito alla presenza di vortici, abbiamo effettuato misure di indentazione su un campione di tessuto di meningioma caratterizzato da un'estesa espressione di vortici non calcifici (Fig. 5.17 a), proprio per aumentare la probabilità di cadere all'interno di un vortice durante l'analisi del campione, data la densità dei vortici presenti. Come dimostrato dalla colorazione di Gomori, le cellule neoplastiche delle formazioni vorticosi sono circondate da una densa rete di fibre reticolari disposte ad anelli concentrici (Fig. 5.17 b).

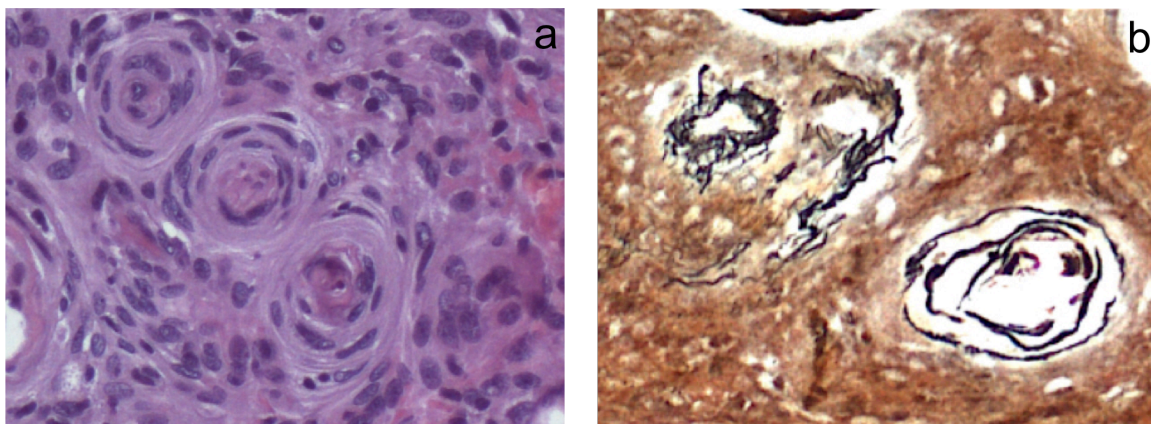


Fig. 5.17 Meningioma Meningoteliale. a: Colorazione con ematossilina-eosina. Meningioma caratterizzato dalla marcata presenza di formazioni vorticosi. Le cellule meningiomatose si presentano allungate e disposte in strati concentrici a formare vortici. b: Colorazione di Gomori. Densa rete di fibre reticolari disposte ad anelli concentrici a formare vortici.

La Figura 5.18 a mostra una tipica mappa di modulo di Young, $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$, acquisita su questo tessuto. I valori assunti da E variano nell'intervallo fra ~ 5 kPa e 150 kPa. Gli istogrammi di frequenza di E corrispondenti sono riportati in Figura 5.18 b. I dati sono mostrati in scala lineare.

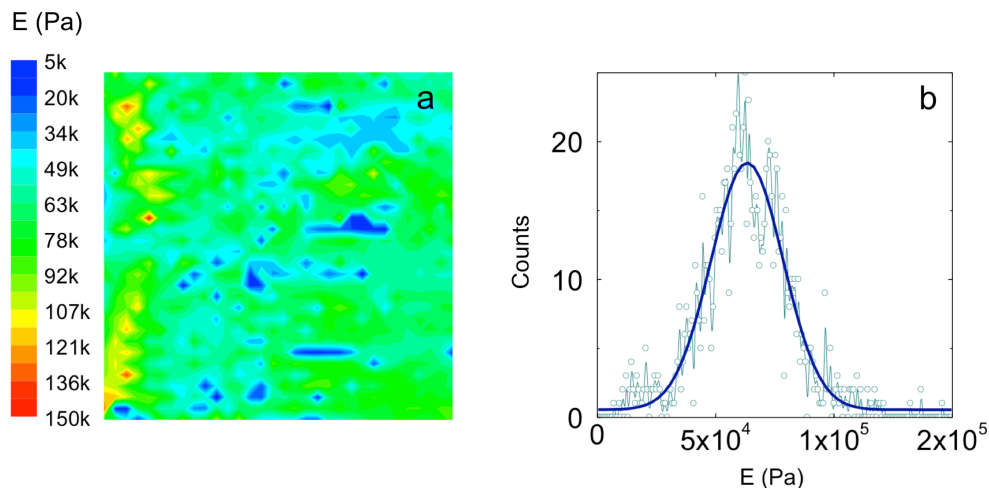


Fig. 5.18 Meningioma meningoteliale con formazioni vorticosi. a: Mappa di modulo di Young

acquisita su un tessuto di meningioma meningoteliale ricco di vortici. b: Istogramma della distribuzione di frequenza dei valori del modulo elastico riportati nella mappa in a.

Si può osservare un singolo picco gaussiano ben definito, centrato a 63300 ± 500 Pa, con una deviazione standard di 30500 ± 1000 Pa. È interessante notare come il centro del picco sia perfettamente in accordo con la terza componente della curva 4 in Figura 5.14, avvalorando ulteriormente l'attribuzione di questa componente ai vortici. Inoltre, l'alto valore medio del modulo di Young è compatibile con la tipica composizione di tali strutture, che sono note esprimere alti livelli di proteine fibrose dal comportamento biomeccanico rigido, come confermato dalla colorazione di Gomori per le fibre reticolari (Fig. 5.17 b).

5.3.5.2 Risposta biomeccanica dei corpi psammomatosi

Le formazioni vorticosi sono costituite da cellule tumorali allungate disposte in modo da dare origine a figure a vortice o concentriche; su queste strutture precipita poi materiale ialino e calcifico e si forma così il caratteristico corpo psammomatoso. Quando è possibile identificare numerosi corpi psammomatosi, si parla di meningioma psammomatoso (Fig. 5.19).

I corpi psammomatosi sono strutture sferiche, concentriche, formate da cristalli di idrossiapatite di calcio depositati su una matrice collagena.³¹¹

La formazione di strutture cristalline composte da idrossiapatite conferisce ai corpi psammomatosi un'estrema rigidità, superiore a quella del *cantilever* utilizzato per le misure di indentazione. Ne segue che la caratterizzazione meccanica di tali formazioni non possa essere effettuata mediante AFM, in virtù della loro indeformabilità. Tale indeformabilità fornisce però un importante strumento che ne consente l'individuazione, come verrà descritto nel seguito.

L'analisi AFM di alcuni campioni tissutali di meningioma, prelevati da uno stesso paziente, ha infatti presentato delle differenze rispetto agli altri tessuti esaminati. L'esame istologico ha confermato la presenza di un meningioma psammomatoso (Grado I secondo WHO) (Fig. 5.19).

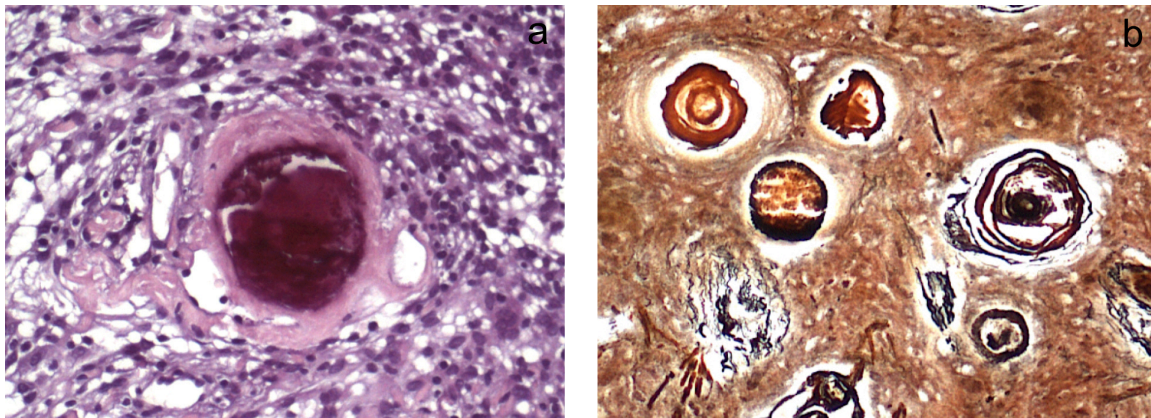


Fig. 5.19 Meningioma psammomatoso. a: Colorazione con ematossilina-eosina. Corpo psammomatoso. Le cellule tumorali appaiono avvolte reciprocamente a formare strati concentrici. Gli strati concentrici (vortici) hanno la tendenza a calcificare dando origine a caratteristiche formazioni ialine note come corpi psammomatosi. b: Colorazione di Gomori. Sono evidenti numerosi vortici e corpi psammomatosi.

In Figura 5.20 a è mostrata una mappa rappresentativa di modulo di Young acquisita su un tessuto di meningioma psammomatoso. La scala di colori utilizzata per rappresentare i valori di E è la stessa utilizzata per i tessuti di meningioma meningoteliale (Fig. 5.13). La mappa mostra un'ampia distribuzione di valori di modulo di Young compresa tra ~ 100 Pa e 5×10^4 Pa, con un'elevata rappresentazione di valori intorno a ~ 10 kPa.

5. Risultati

E' inoltre possibile identificare chiaramente una regione di colore nero, caratterizzata da un modulo di Young superiore a 10^8 Pa, che rappresenta il massimo valore misurabile mediante la strumentazione utilizzata. Tale regione è caratterizzata quindi da un valore di E significativamente maggiore rispetto a quello del tessuto durale (Fig. 5.13 c). Questa estrema rigidità meccanica ci consente di attribuire tale regione alla presenza di corpi psammomatosi caratterizzati da estese formazioni cristalline.

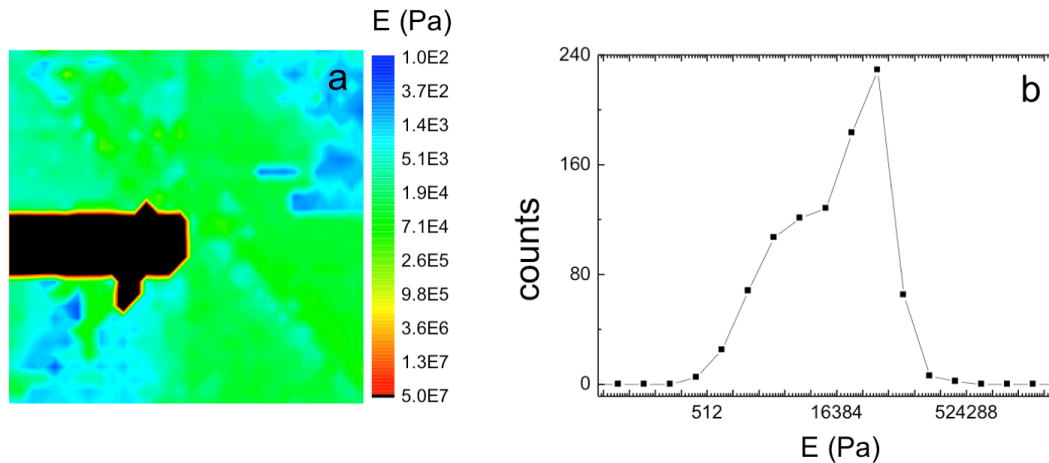


Fig. 5.20 a: Mappa rappresentativa di modulo di Young acquisita su un tessuto di meningioma psammomatoso. b: Istogramma di frequenza dei valori di modulo di Young (E) calcolato a partire dai dati riportati nella mappa in a.

In Figura 5.20 b è mostrato un istogramma di frequenza dei valori di modulo di E calcolato a partire dai dati riportati in Figura 5.20 a. Il modulo di Young della regione dei corpi psammomatosi non è stato tenuto in considerazione nel calcolo delle frequenze in virtù del fatto che non può essere misurato mediante AFM. Da un'analisi quantitativa dell'istogramma di frequenza è possibile stimare un valor medio di modulo di Young pari a $\sim 2 \times 10^4$ Pa. Tale valore è coerente con il valore atteso per un tipico tessuto di meningioma di grado I (Fig. 5.13 a,b). La distribuzione delle frequenze mostra una marcata spalla associata a un picco, corrispondenti a due classi di valori piccati intorno a $\sim 5 \times 10^3$ Pa e 4×10^4 Pa. Si osserva inoltre una brusca diminuzione della frequenza per valori di E superiori a 5×10^4 Pa, al di sopra dei quali i conteggi sono identicamente nulli.

Come mostrato in Figura 5.18, l'intervallo dei valori di E compreso tra $\sim 4 \times 10^4$ Pa e 1×10^5 Pa contiene il *fingerpritt* biomeccanico di formazioni vorticosi caratterizzate da un'elevata espressione di proteine fibrose. L'assenza del contributo di queste strutture è in accordo con il meccanismo di formazione delle calcificazioni descritto in precedenza, secondo il quale le formazioni vorticosi fornirebbero il substrato ideale per innescare il processo di nucleazione di strutture cristalline.

Tale processo di biomineralizzazione appare estremamente interessante, presentando aspetti simili al processo di formazione del tessuto osseo e pertanto merita uno studio più approfondito. Tale studio potrebbe essere effettuato mediante tecniche avanzate di diffrazione di raggi X, come riportato in letteratura,³¹² che consentono di studiare la complessa relazione tra la formazione di cristalli di idrossiapatite e la riorganizzazione delle fibre di collagene presenti all'interno delle strutture vorticosi.

5.3.6 Ruolo delle forze viscoelastiche nel comportamento biomeccanico del meningioma

È stato studiato il ruolo delle forze viscoelastiche nel comportamento biomeccanico dei tessuti di meningioma e di dura madre infiltrata da cellule meningiomatose. In Figura 5.21 a è riportata una mappa dei valori di isteresi (H) acquisita su un campione rappresentativo di meningioma meningoteliale. Misure analoghe sono state acquisite sui rimanenti campioni tissutali di meningioma meningoteliale ottenendo risultati simili. In Figura 5.21 b è riportato l'istogramma di frequenza dei valori di H ottenuto dall'elaborazione della mappa in Figura 5.21 a. In Figura 5.21 c è mostrata una mappa dei valori di H acquisita su un campione rappresentativo di dura madre infiltrata. La mappa è stata ottenuta applicando l'eq. [8] alle curve di *approach-retract* relative alla mappa di modulo di Young presentata in Figura 5.13 c. Misure analoghe sono state acquisite su i rimanenti campioni di dura infiltrata ottenendo risultati simili. In Figura 5.21 d viene mostrato l'istogramma delle frequenze calcolato a partire dalla mappa in Figura 5.21 c, relativa alla dura infiltrata.

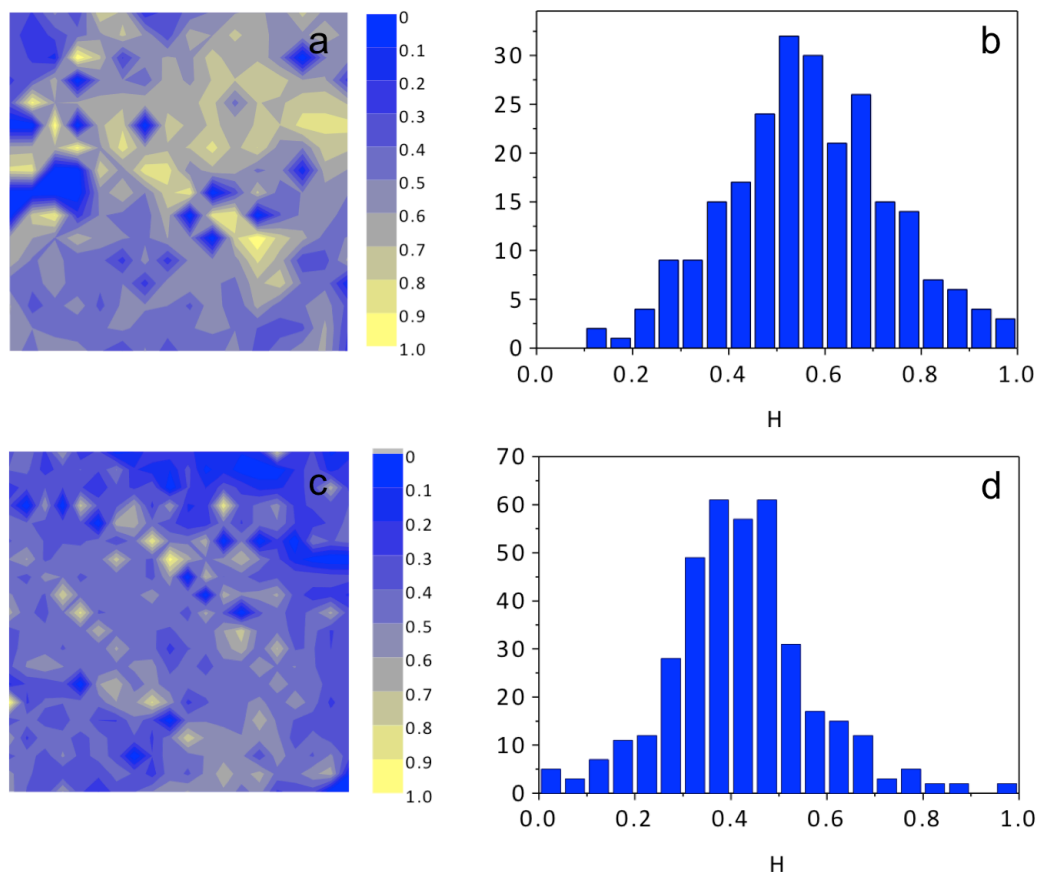


Fig. 5.21 a: Mappa dei valori di isteresi (H) acquisita su un campione rappresentativo di meningioma meningoteliale. b: Istogramma di frequenza dei valori di H ottenuto dall'elaborazione della mappa in a. c: Mappa dei valori di H acquisita su un campione rappresentativo di dura madre infiltrata da cellule di meningioma. d: Istogramma delle frequenze calcolato a partire dalla mappa in c.

Entrambe le mappe riportate in Figura 5.21 presentano valori di H compresi nell'intervallo fra 0 e 1. Tuttavia, mettendole a confronto, è possibile notare che la mappa in Figura 5.21 a presenta in media valori di H più elevati rispetto a quella riportata in Figura 5.21 c, come evidenziato chiaramente da una maggiore frequenza di aree gialle, colore che corrisponde a valori compresi nell'intervallo di H fra 0.8 e 1 (scale riportate a destra delle mappe). Un valore di H di 0.8 indica che è stato dissipato circa l'80% dell'energia applicata durante il

processo di indentazione, ne segue che valori di H di questo ordine di grandezza sono indice del fatto che le forze dissipative hanno un ruolo fondamentale nel determinare la risposta biomeccanica dei campioni di meningioma esaminati. Al contrario, nella mappa relativa alla dura madre infiltrata (Fig. 5.21 c) sono pressoché assenti le regioni gialle caratterizzate da un alto valore di H , a dimostrazione del fatto che il tessuto durale presenta un comportamento biomeccanico maggiormente elastico rispetto a quello dei meningiomi.

Analizzando gli istogrammi di frequenza, quello in Figura 5.21 b appare simmetrico, con valori di H distribuiti nell'intervallo tra 0.2 e 1 e presenta un picco ben definito intorno al valore 0.5. È possibile stimare un valore medio di H pari a 0.53 ± 0.22 . I dati sono espressi in termini di valore medio \pm deviazione standard. L'istogramma in Figura 5.21 d mostra valori di H compresi nell'intervallo fra 0 e 1; si presenta abbastanza simmetrico con un picco ben definito intorno a 0.4. È possibile stimare un valore medio di H pari a 0.4 ± 0.17 .

Da un'analisi comparativa dei due istogrammi è possibile notare che quello relativo alla dura madre infiltrata (Fig. 5.21 d) presenta una distribuzione dei valori di H più stretta rispetto a quello relativo ai tessuti di meningioma (Fig. 5.21 b). Ciò è confermato dal valore della deviazione standard calcolata sull'istogramma di frequenza in Figura 5.21 d che risulta inferiore rispetto al valore stimato per il tessuto di meningioma. È inoltre possibile osservare che nell'istogramma riportato in Figura 5.21 d vi è una netta diminuzione dei contributi ad alti valori di H (> 0.5).

I dati suggeriscono che il contributo intorno a valori di H di 0.4, su cui è centrato il picco dell'istogramma durale (Fig. 5.21 d), possa essere attribuito alla presenza di proteine connettivali fibrose, componenti strutturali della dura madre stessa. Pertanto questo contributo sarebbe fornito da regioni di dura madre non infiltrata da cellule neoplastiche. Non deve stupire che tale contributo sia apprezzabile anche nell'istogramma relativo al tessuto di meningioma (Fig. 5.21 b); infatti abbiamo visto che la principale funzione di derivazione mesenchimale delle cellule di meningioma è la loro capacità di elaborare proteine della matrice extracellulare, a tale funzione simil-fibroblastica delle cellule tumorali di meningioma consegue una sovra-espressione di proteine fibrose il cui contributo viene rilevato a questi stessi valori di H , anche se in misura minore, su tutti i tessuti di meningiomi.

Il contributo a valori di H di circa 0.6 è attribuibile, invece, alla presenza di cellule neoplastiche. L'istogramma che si riferisce al tessuto durale (Fig. 5.21 d) presenta una spalla intorno a questi valori di H , tale contributo è verosimilmente riconducibile alla porzione di dura madre infiltrata che pertanto contiene cellule neoplasiche caratterizzate da un comportamento in cui le forze dissipative giocano un ruolo più rilevante. A conferma di ciò è possibile notare che nell'istogramma che si riferisce al tessuto di meningioma (Fig. 5.21 b) il contributo intorno a valori di H di 0.6 è nettamente più rappresentato.

La netta diminuzione dei contributi ad alti valori di H (> 0.5) nell'istogramma durale riportato in Figura 5.21 d rispetto all'istogramma relativo al tessuto di meningioma (Fig. 5.21 b) giustifica il valore medio dell'isteresi misurato sui tessuti di dura infiltrata che è risultato, come atteso dall'esperienza nella pratica chirurgica, nettamente inferiore a quello misurato sui tessuti di meningioma. Tali risultati sono in accordo con la differente composizione strutturale dei campioni esaminati: il tessuto durale infatti è costituito prevalentemente da proteine fibrose ed è quindi caratterizzato da una risposta biomeccanica prevalentemente di tipo elastica; il tessuto di meningioma, pur presentando componenti fibrose, è ricco di cellule neoplastiche che gli conferiscono un comportamento viscoelastico, in cui le forze dissipative hanno un ruolo rilevante.

Un'ulteriore differenza che può essere ravvisata dal confronto fra i due istogrammi è la totale assenza di contributi compresi tra valori di H tra 0 e 0.1 nell'istogramma relativo al tessuto di meningioma (Fig. 5.21 b) rispetto a quello relativo al tessuto durale (Fig. 5.21 d). In quest'ultimo, infatti, tale contributo è presente, sebbene in piccola misura.

Questi contributi, in accordo con l'interpretazione fornita, sono indicativi della presenza nel campione durale esaminato di strutture con un comportamento puramente elastico. Ciò è

5. Risultati

attribuibile alla presenza di tessuto connettivo fibroso denso, ricco di fibre elastiche, caratteristico della dura madre normale.

È stato studiato il ruolo delle forze viscoelastiche nel comportamento biomeccanico anche del tessuto di meningioma ricco in formazioni vorticosi.

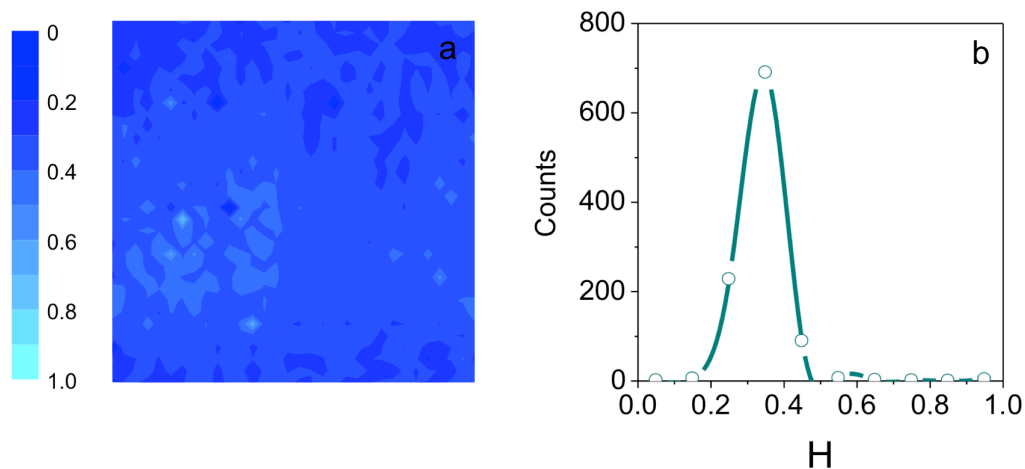


Fig. 5.22 Meningioma meningoteliale con formazioni vorticosi. a: Mappa di isteresi (H) misurata nella regione tissutale ricca di vortici. b: Istogramma della distribuzione di frequenza dei valori di H relativi alla mappa in a.

Le Figure 5.22 a,b mostrano rispettivamente la mappa di isteresi e il corrispondente istogramma di frequenza misurati in una regione tissutale di meningioma meningoteliale ricca di vortici. L'istogramma di frequenza dei valori di H mostra un picco singolo, stretto, centrato a 0.35 ± 0.1 (media \pm deviazione standard). Si può notare come il valore medio di H misurato all'interno del vortice sia significativamente più basso dei valori di H trovati nei tessuti di meningioma e in quelli di dura madre infiltrata da cellule meningiomatose. Questo basso valore di isteresi è in accordo con l'alta espressione di proteine fibrose presenti all'interno dei vortici.

Un'ulteriore analisi quantitativa degli istogrammi di frequenza ed una deconvoluzione gaussiana dei diversi contributi potrebbe fornire un'attribuzione più precisa di tali contributi alle strutture presenti nei tessuti esaminati. L'implementazione di tale analisi è attualmente in fase di sviluppo.

5.3.7 Caratterizzazione biomeccanica di meningiomi di grado II WHO

La Figura 5.23 a mostra una mappa rappresentativa di modulo di Young acquisita analizzando campioni di meningioma atipico (Grado II WHO), come confermato dall'analisi istologica (Fig. 5.24 a).

Un'analisi comparativa della mappa dei meningiomi di grado II (Fig. 5.23 a) con quelle rappresentative dei meningiomi di grado I (Fig. 5.13 a,b) evidenzia una netta diminuzione del valore medio di modulo di Young (E) nei gradi II. Per questi ultimi, infatti, i valori di E sono compresi nell'intervallo tra poche decine di Pa e ~ 10 kPa, con una chiara prevalenza intorno a qualche centinaio di Pa, compatibile con i valori tipici di una risposta di natura cellulare. La prevalenza di valori intorno ad alcune centinaia di Pa è chiaramente visibile osservando la mappa che si presenta uniformemente di colore azzurro (Fig. 5.23 a); al contrario, nella mappa dei meningiomi di grado I (Fig. 5.13 a,b) è osservabile una prevalenza di colore verde, indice della presenza di strutture caratterizzate da un modulo elastico di alcune decine di kPa; e infine, nella mappa rappresentativa della dura madre sono visibili prevalentemente aree rosse (Fig. 5.13 c) che corrispondono a valori di E dell'ordine dei MPa.

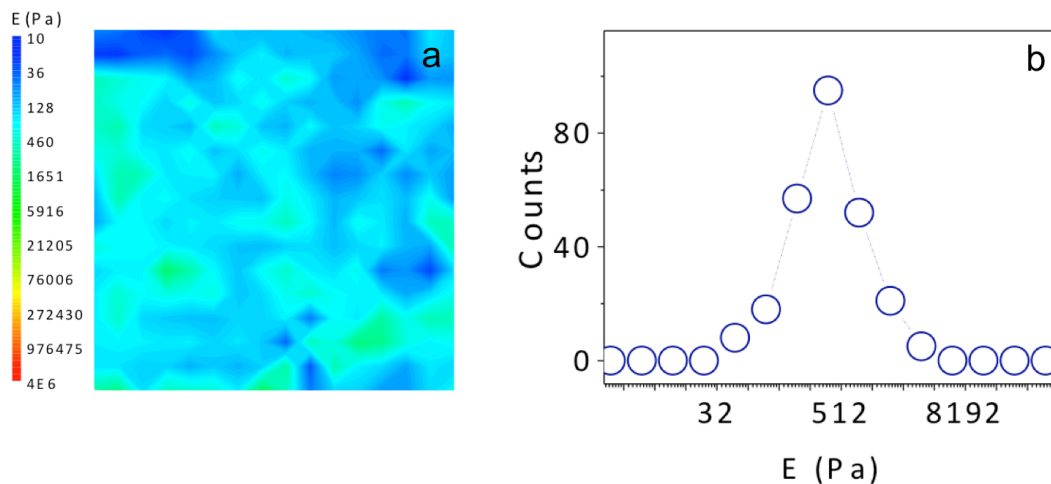


Fig. 5.23 a: Mappa di modulo elastico di Young rappresentativa dei tessuti di meningioma atipico di grado II secondo WHO. b: Istogramma della distribuzione di frequenza dei valori del modulo di Young relativi alla mappa in a.

In Figura 5.23 b viene riportato l'istogramma di frequenza dei moduli di Young relativi alla mappa in Figura 5.23 a. L'istogramma presenta un andamento unimodale con un picco ben definito centrato intorno a 500 Pa. Da un'analisi quantitativa dell'istogramma è possibile stimare un valor medio di modulo di Young di 400 Pa e una deviazione standard di 240 Pa. Ricordiamo che i campioni tissutali di meningioma di grado I analizzati presentano un valor medio di E compreso nell'intervallo tra 10 kPa e 20 kPa. Tale valore è di circa due ordini di grandezza maggiore rispetto al valor medio di E per i meningiomi di grado II. Questo dato costituisce un risultato sperimentale chiave nella caratterizzazione biomeccanica dei tessuti di meningioma tramite AFM, in virtù del fatto che consente di distinguere con bassissimo margine di errore i meningiomi di grado II da quelli di grado I.

La minore rigidità misurata sui tessuti di meningioma di grado II rispetto a quelli di grado I è in accordo con i riscontri istologici. In Figura 5.24 a è riportato un esame istologico rappresentativo di meningioma di grado II. L'indagine istologica evidenzia un'elevata cellularità, tipica dei meningiomi di grado II, che risulta in accordo con quanto suggerito dalla caratterizzazione biomeccanica. L'elevata cellularità si accompagna ad una scarsa rappresentazione delle componenti fibrose della matrice extracellulare, come confermato dalla

colorazione di Gomori per le fibre connettivali reticolari riportata in Figura 5.24 b che documenta l'assenza della componente reticolare intercellulare. La mancata espressione di tali proteine fibrose è in accordo con l'assenza dei contributi ad alti valori di E nell'istogramma in Figura 5.23 b.

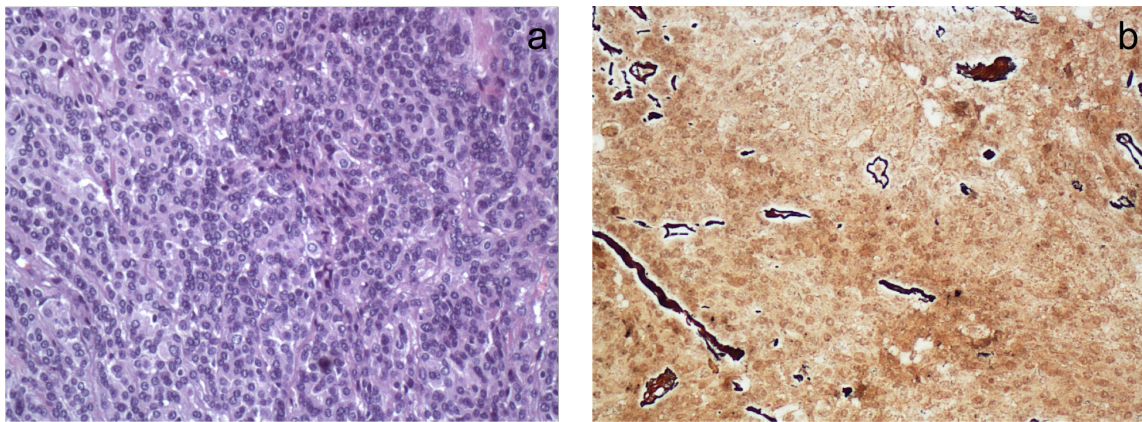


Fig. 5.24 Meningioma atipico (Grado II WHO). a: Colorazione con ematossilina-eosina. Meningioma caratterizzato da elevata cellularità, con aree di crescita diffusa e figure mitotiche. Le cellule presentano margini indistinti con aspetto sinciziale e aree di crescita “sheet-like” senza lobularità. b: Colorazione di Gomori. Assenza della componente reticolare intercellulare.

Come è stato descritto nel paragrafo 2.3, la modalità di crescita e sviluppo dei meningiomi è, tra gli altri fattori, legata ad un bilanciamento fine dell'espressione delle metalloproteasi (MMP) e dei loro inibitori (TIMP). Tale equilibrio consente al tumore di digerire le proteine fibrose della matrice extra-cellulare per consentirne la crescita e l'espansione.

Nei meningiomi di grado I l'espressione delle MMP ai margini del tumore è finemente modulata in maniera funzionale alla sua espansione. Questo equilibrio fine tra MMP e TIMP viene perso nei meningiomi di alto grado, in cui la sovra-espressione di MMP non è più controbilanciata dall'espressione delle TIMP. Ne segue che le componenti fibrose del tessuto vengono massivamente digerite, sicché l'analisi AFM non ne rileva la presenza. Data la considerevole differenza tra le risposte meccaniche dei meningiomi di grado I rispetto ai meningiomi di grado II, la caratterizzazione biomeccanica consente di distinguerli in maniera efficace. Inoltre, dai dati sperimentali mostrati, è lecito supporre che la caratterizzazione biomeccanica possa essere utilizzata per identificare quei tessuti che hanno una maggiore propensione a virare al grado II. La possibilità di identificare tramite AFM il fenomeno del viraggio da meningioma di grado I a meningioma di grado II WHO appare estremamente importante e meritevole di uno studio approfondito che è in programma.

È stata eseguita anche per i meningiomi di grado II una quantificazione dell'isteresi. È interessante notare come l'isteresi dei meningiomi di grado II sia decisamente superiore rispetto a quella dei meningiomi di grado I con un valore medio di 0.6 ± 0.14 (media \pm deviazione standard della media), ciò è in accordo con l'elevata cellularità riscontrata in questi tumori, accompagnata da una scarsa rappresentazione delle componenti fibrose della matrice extracellulare, ne deriva pertanto una risposta prevalentemente di tipo viscoso con ridotta risposta di tipo elastica, rispetto ai meningiomi di grado I.

5.3.8 Caratterizzazione delle proprietà di adesione dei tumori cerebrali

Una valutazione quantitativa dell'adesione dei tessuti misurati è estremamente rilevante sia ai fini di una migliore identificazione del *fingerprint* biomeccanico delle lesioni cerebrali, sia ai fini dell'ottimizzazione delle procedure neurochirurgiche.

Pertanto, sui tessuti di glioblastoma, meningioma e sostanza bianca analizzati è stato stimato il lavoro di adesione (WA) necessario a separare il *cantilever* dal tessuto a seguito del processo di indentazione.

In Figura 5.25 a è mostrato l'istogramma delle frequenze di WA acquisito in una regione necrotica di un tessuto di glioblastoma multiforme. Il lavoro di adesione è espresso in unità di 10^{-15} Joule. In Figura 5.25 b-d sono mostrati gli istogrammi di frequenza di WA per i tessuti rappresentativi rispettivamente di meningioma, glioblastoma multiforme e sostanza bianca.

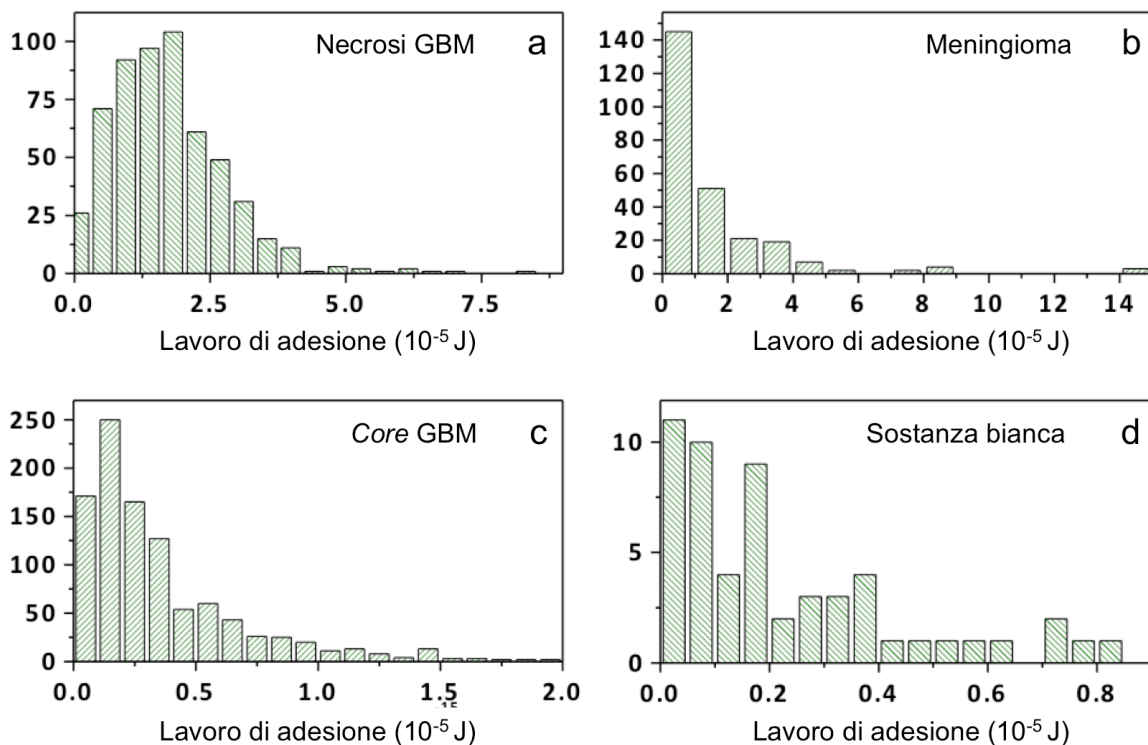


Fig. 5.25 Iistogrammi di frequenza del lavoro di adesione espresso in unità di 10^{-15} Joule, acquisito in un tessuto rappresentativo di necrosi di glioblastoma (a), meningioma (b), *core* del glioblastoma (c), sostanza bianca (d).

Da un'analisi degli istogrammi di frequenza appare evidente che la sostanza bianca sana (Fig. 5.25 d) presenta valori di lavoro di adesione significativamente minori rispetto a quelli relativi alle altre categorie tissutali patologiche esaminate (Fig. 5.25 a-c). Nell'istogramma in Figura 5.25 d, infatti, l'intervallo dei dati di WA è compreso tra 0 e 0.8×10^{-15} J, mentre per gli altri istogrammi l'intervallo dei dati è significativamente più ampio: $0-7.5 \times 10^{-15}$ J per la necrosi del glioblastoma, $0-14 \times 10^{-15}$ J per il meningioma e $0-2 \times 10^{-15}$ J per il *core* del glioblastoma. Tutti gli istogrammi di frequenza mostrano un certo grado di asimmetria, caratterizzato dalla presenza di una coda della distribuzione ad alti valori di WA. Tale coda appare meno marcata per la necrosi del glioblastoma, rispetto al meningioma, al *core* del glioblastoma e alla sostanza bianca. Questa caratteristica è in accordo con l'omogeneità intrinseca del tessuto necrotico evidenziata, come visto, sia dalla distribuzione di modulo di Young ed isteresi che dagli esami istopatologici.

5. Risultati

Un'ulteriore caratteristica comune a tutti i campioni esaminati è la presenza di un numero significativo di dati fuori scala (*outlier*). La presenza di *outlier* rende la media uno stimatore poco efficace al fine del confronto delle diverse popolazioni. Pertanto sono stati confrontati i dati ottenuti comparando le mediane delle distribuzioni che non risentono della presenza di *outlier*.

Tessuto cerebrale	Mediana \pm interquartile (10^{-15} J)
Necrosi di glioblastoma	1.5 ± 1.0
Core di glioblastoma	0.28 ± 0.36
Meningioma	0.8 ± 1.4
Sostanza bianca	0.17 ± 0.25

Tabella 5.1 Valori delle mediane dei campioni tissutali cerebrali esaminati.

In Tabella 5.1 sono mostrati i valori delle mediane dei campioni tissutali misurati. I valori sono espressi in termini di mediana \pm scarto interquartile.

E' possibile notare che, come osservato dall'analisi degli istogrammi di frequenza, il tessuto cerebrale sano presenta una mediana dell'adesione significativamente più piccola rispetto ai tessuti tumorali. Il maggior valore di adesione è invece stato riscontrato per i tessuti necrotici. Una possibile interpretazione di quest'ultimo risultato risiede nel fatto che il lavoro di adesione è proporzionale alla superficie della punta dell'AFM a contatto con il campione sotto esame. Essendo, come visto in precedenza, le regioni necrotiche di glioblastoma significativamente più morbide rispetto ai restanti tessuti esaminati, la punta AFM penetra maggiormente all'interno di un campione tissutale di necrosi durante le misurazioni, risultandone in un maggiore lavoro di estrazione della punta stessa dal tessuto.

Le differenze riscontrate nelle mediane dei diversi tessuti cerebrali esaminati suggeriscono che il lavoro di adesione possa essere utilizzato come ulteriore parametro che aiuti a definire il *fingerprint* biomeccanico dei tumori cerebrali rispetto alla sostanza bianca normale. Sono attualmente in corso studi di approfondimento sulle caratteristiche di adesione dei tessuti cerebrali oggetto di questa tesi.

DISCUSSIONE

Nel corso dell'ultimo decennio, sta emergendo ampia evidenza che il microambiente biomeccanico del tumore influenzi profondamente le cellule.¹ In condizioni fisiologiche, le cellule sono soggette a un ampio spettro di forze fisiche e meccaniche, le quali giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo e nel mantenimento del tessuto, modulando la proliferazione cellulare, la differenziazione e l'apoptosi. Il modo in cui le cellule percepiscono queste forze, e quindi rispondono ad esse, è in larga parte mediato dalla matrice extracellulare, che rappresenta la principale componente del microambiente in cui esse sono immerse.²⁻⁵ In molte condizioni patologiche, come in presenza di neoplasie, si verifica uno stravolgimento dell'omeostasi meccanica che regola la complessa interazione fra le cellule e la loro matrice extracellulare.⁵ L'insorgenza e la progressione del tumore, infatti, si accompagnano a importanti alterazioni nelle proprietà meccaniche sia delle cellule sia della matrice extracellulare che le circonda, che si riflettono a loro volta in modificazioni meccaniche dei tessuti.^{5,6}

Il microscopio a forza atomica è stato utilizzato in modo crescente negli ultimi anni nel campo della biologia cellulare, consentendo di sondare direttamente le proprietà meccaniche di cellule e tessuti e di fornire stime quantitative delle modificazioni che avvengono nel corso dell'oncogenesi e della progressione tumorale.

Misure di microscopia a forza atomica (AFM) hanno rafforzato la nostra comprensione della meccanica delle cellule in condizioni normali e patologiche, fornendo dati di enorme rilevanza per lo studio della fisiopatologia della malattia tumorale e aprendo la strada a nuove opzioni diagnostiche e terapeutiche.^{7,12} La fenotipizzazione meccanica delle cellule mediante microscopia a forza atomica è stata recentemente proposta come nuovo strumento di ricerca in ambito oncologico umano.¹³

A partire dal 2007 sono iniziati i primi studi sulle proprietà biomeccaniche di cellule neoplastiche umane tramite AFM,¹⁴ contribuendo negli anni a caratterizzare le proprietà meccaniche di cellule provenienti da diversi tipi di tumori (e.g., mammario,¹⁵ ovarico,¹⁶ colon¹⁷, rene¹⁸). Tali lavori hanno tutti dimostrato come le cellule cancerose siano più "soffici" rispetto alla controparte sana.¹⁴⁻²⁰

Tuttavia, la maggior parte degli studi AFM sulle proprietà biomeccaniche condotti fino ad oggi si è concentrata sull'analisi delle risposte di singole cellule, analizzate al di fuori del loro microambiente naturale. A tal proposito è importante sottolineare che in ambito neuro-oncologico la maggioranza degli studi sul glioblastoma è stata effettuata su cellule in coltura o, in alcuni casi, su campioni di tessuto prelevati chirurgicamente ma da modelli animali. Eppure, come descritto ampiamente in precedenza, l'ambiente extracellulare gioca un ruolo chiave nel modulare le risposte biomeccaniche cellulari. Lo studio di singole cellule analizzate al di fuori del loro microambiente naturale non tiene in considerazione l'influenza sul comportamento biomeccanico dei rapporti intercellulari e di quelli che intercorrono fra cellule e matrice extracellulare circostante.

Volendo caratterizzare le proprietà biomeccaniche di una patologia tumorale, diviene fondamentale indagare sul comportamento dell'intero tessuto neoplastico piuttosto che sulla singola cellula. La caratterizzazione biomeccanica tissutale consente di indagare le risposte meccaniche del tumore analizzato nelle condizioni quanto più vicine a quelle naturali. Analisi tramite AFM di tessuti neoplastici permettono di misurare i campioni tumorali nel proprio contesto biologico, valutandone il comportamento biomeccanico similmente a quanto avviene nel microambiente naturale in cui il tumore si sviluppa.

Le prime misure di *stiffness* tramite AFM registrate su tessuti biologici, dunque senza trascurare il ruolo dell'ambiente extracellulare, hanno consentito di distinguere cellule cancerose da cellule non maligne e da cellule cancerose meno differenziate in base alla risposta elastica.²¹

Le potenzialità dell'analisi meccanica di un tessuto neoplastico sono state indagate in modo quantitativo solo recentemente. Plodinec M. et al. hanno presentato il primo lavoro riportato in letteratura nel 2012 in cui è stata eseguita una caratterizzazione nanomeccanica tramite AFM di tessuti mammari umani e non di singole cellule.²² Gli autori, analizzando biopsie di carcinoma mammario umano e valutandone le caratteristiche di *stiffness*, hanno identificato proprietà meccaniche uniche, una “impronta nanomeccanica” specifica per il carcinoma mammario, che può essere di aiuto nella distinzione e definizione dei diversi stadi della progressione neoplastica. Dallo studio emerge che le mappe di *stiffness* rilevate su tessuti biotipici sani e su neoformazioni benigne mostrano un profilo uniforme, con una distribuzione di valori caratterizzata da un singolo picco ben distinto; in contrasto, i tessuti maligni presentano una distribuzione più ampia, che correla con l'eterogeneità del tessuto, con picchi in corrispondenza dei valori più bassi di *stiffness* rappresentativi delle cellule cancerose.²² Questi risultati forniscono non soltanto nuovi possibili marker biomeccanici per valutare l'insorgenza del cancro, ma anche nuovi indici prognostici, sia pur limitatamente al carcinoma mammario.

In contrasto con la morbidezza delle cellule, i tessuti tumorali sembrano essere significativamente più rigidi rispetto a quelli sani.²³ Questa aumentata rigidità è una caratteristica distintiva fondamentale della patologia neoplastica, nota e riconosciuta in ambito oncologico, tanto da venir quotidianamente utilizzata durante la valutazione clinica dei pazienti: la palpazione rimane ancora oggi uno strumento chiave per la diagnosi di molti tumori la cui consistenza e rigidità aumentate ne permettono spesso una identificazione clinica prima che strumentale.²³ Tale alterazione è principalmente una diretta conseguenza di un'aumentata deposizione di proteine della matrice extracellulare come collagene, fibronectina e laminina ad opera delle cellule tumorali stesse.^{22,24}

Dopo il pionieristico lavoro di Plodinec M. et al. nel corso degli ultimi tre anni è stata posta attenzione sull'importanza di identificare e definire le proprietà biomeccaniche dei tessuti tumorali.²⁵⁻²⁷ Molto recentemente, Tian M. et al. hanno mostrato come l'impronta nanomeccanica del tessuto epatico sia direttamente correlata allo sviluppo del carcinoma epatocellulare.²⁷

Ad oggi non risulta alcuno studio in letteratura che esamini le proprietà biomeccaniche dei tessuti cerebrali tramite AFM in campioni biologici umani, né che proponga un'analisi differenziale delle proprietà biomeccaniche mettendo a confronto neoplasia cerebrale maligna, neoplasia benigna e tessuto cerebrale sano.

Il glioblastoma multiforme (GBM) rappresenta il più comune tumore cerebrale maligno dell'adulto e il meningioma il più comune tumore cerebrale benigno.²⁸ Questi tumori rappresentano pertanto una fra le principali cause neuro-oncologiche che portano il paziente all'osservazione neurochirurgica cui consegue, solitamente, l'intervento di asportazione chirurgica della lesione.

Questo lavoro riporta uno studio approfondito sulle proprietà nanomeccaniche di campioni tissutali di glioblastomi e di meningiomi prelevati in sede di asportazione chirurgica, analizzati tramite misure di indentazione AFM (IT-AFM) e sottoposti ad indagini anatomico-patologiche di tipo istologico (ematossilina-eosina, Gomori per le proteine fibrose) ed istochimico (alcian blu per l'acido ialuronico) per conferma diagnostica e di caratterizzazione delle molecole della matrice extracellulare.

Questa è la prima caratterizzazione biomeccanica di tessuto di glioblastoma multiforme e di meningioma in letteratura pertanto, per identificare gli attori principali della risposta biomeccanica tissutale, abbiamo confrontato in maniera estensiva le mappe di *stiffness* e viscoelasticità con i riscontri istologici, così da identificare alcuni elementi caratteristici delle neoplasie studiate, la cui identificazione e discriminazione possa essere di ausilio in ambito diagnostico, terapeutico e prognostico, quali ad esempio la presenza di aree di necrosi e di vasi nel GBM, e l'eventuale presenza di infiltrazione della dura madre nel meningioma.

Lo studio è stato condotto nell'intento di identificare e validare nuovi marker biomeccanici in grado di discriminare neoplasie cerebrali maligne, benigne e tessuto sano e, ove possibile, individuare l'interfaccia tumore/tessuto sano. Il confronto con i riscontri istologici ed istochimici ci ha permesso di identificare il *fingerprint* biomeccanico delle principali componenti dei tessuti tumorali oggetto di questo studio.

Per valutare le proprietà biomeccaniche dei tessuti in esame sono stati utilizzati il modulo elastico di Young, che fornisce informazioni sulla rigidità dei tessuti, l'isteresi e l'adesione che forniscono informazioni quantitative sul ruolo delle forze viscoelastiche nella risposta meccanica dei tessuti. I tessuti biologici sono costituiti da numerose strutture, cellule e matrice extracellulare innanzitutto, dunque una singola curva d'indentazione acquisita in una posizione casuale del campione non sarebbe rappresentativa del comportamento biomeccanico dell'intero tessuto. Pertanto è stato eseguito un *mapping* alla nanoscala acquisendo mappe dei tessuti di circa $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$. Mappe di tale grandezza non sono state riportate in precedenza in letteratura; esse sono state acquisite grazie all'aumentata escursione verticale resa possibile dalla combinazione del piezo JPK convenzionale con il modulo aggiuntivo JPK *cellHesion*. Con il modulo aggiuntivo è possibile acquisire mappe fino a circa $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$. L'acquisizione di mappe di tale grandezza ci ha consentito di aumentare la statistica e di analizzare regioni di tessuto sufficientemente ampie da essere comparate con quelle osservabili all'analisi istologica convenzionale.

Oltre alla distribuzione spaziale con mappe alla nanoscala, le proprietà meccaniche dei tessuti sono state valutate mediante le loro distribuzioni di frequenza, fornendo così un *fingerprint* biomeccanico quantitativo per ciascun tessuto, di possibile immediata applicazione in campo diagnostico. Al riguardo, è importante ricordare che lo *staging* dei tumori è oggi largamente affidato agli esami istologici standard. Tali esami si basano però sull'utilizzo di criteri puramente qualitativi e sono inoltre operatore-dipendente e pertanto soggetti a *bias*. Al contrario, i parametri forniti dall'analisi delle mappe di modulo elastico ed isteresi e dalle rispettive distribuzioni di frequenza forniscono dei risultati quantitativi, indipendenti dall'operatore.

6.1 L'impronta nanomeccanica dei tumori cerebrali

Per discutere i numerosi risultati emersi da questo studio, in Figura 6.1 sono riassunti i valori medi del modulo elastico di Young (E) su tutti i campioni esaminati per ciascuna tipologia tissutale studiata e in Figura 6.2 sono mostrati i valori medi dell'isteresi (H) su tutti i campioni esaminati per ciascun tessuto studiato.

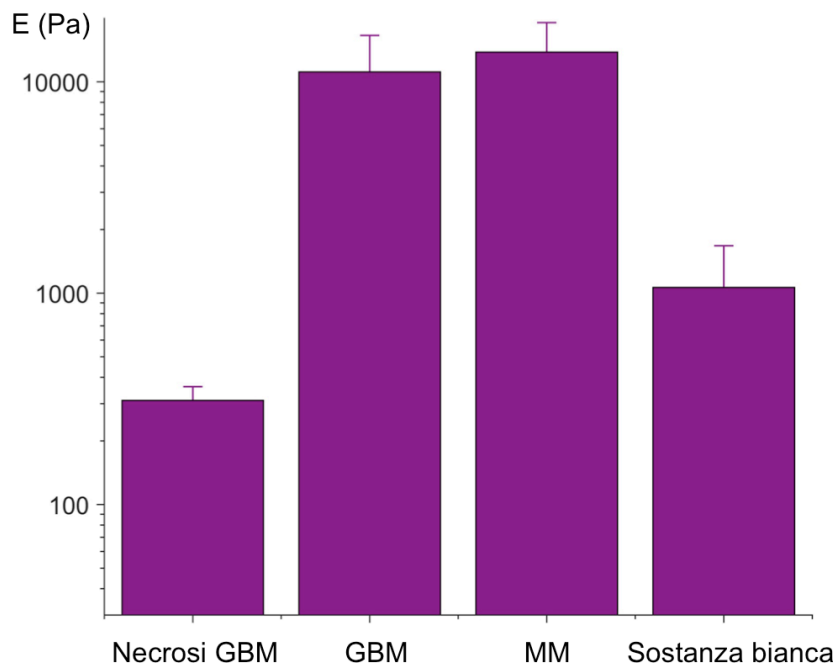


Fig. 6.1 Valori medi del modulo di Young (E) calcolati su tutti i campioni tissutali esaminati: necrosi del glioblastoma, *core* del glioblastoma, meningiomi (MM) e sostanza bianca normale.

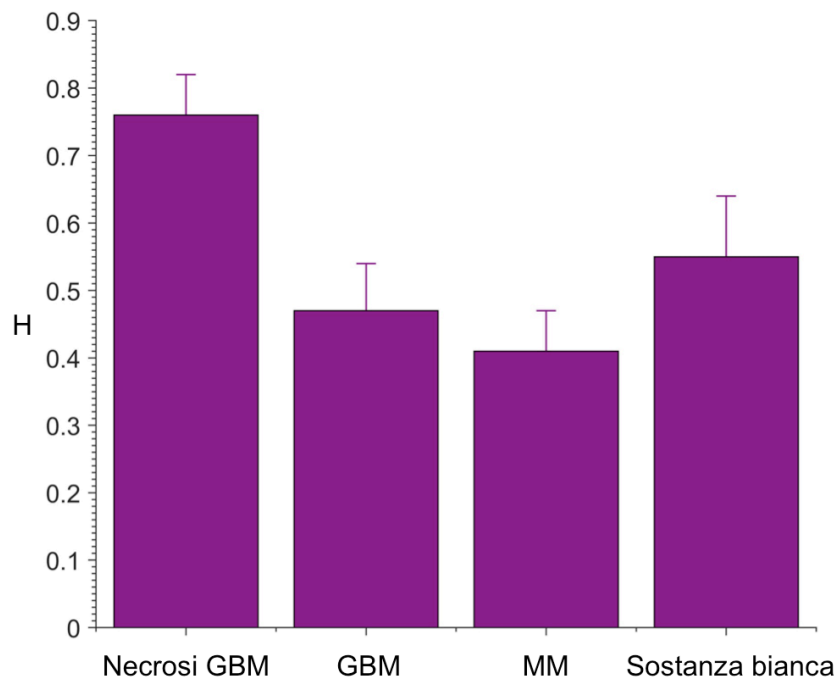


Fig. 6.2 Valori medi di isteresi (H) calcolati su tutti i campioni tissutali esaminati: necrosi del glioblastoma, *core* del glioblastoma, meningiomi (MM) e sostanza bianca normale.

In Figura 6.1 è immediatamente evidente come sia il *core* del glioblastoma (11100 ± 5500 Pa) sia il meningioma (13900 ± 5200 Pa) presentino una rigidità estremamente aumentata, di circa un ordine di grandezza maggiore rispetto alla *stiffness* della sostanza bianca sana (1060 ± 610 Pa). Viceversa, la necrosi del glioblastoma si presenta notevolmente più soffice (310 ± 50 Pa), con una *stiffness* di circa quattro volte più bassa rispetto al tessuto sano e di circa due ordini di grandezza inferiore rispetto al *core* del glioblastoma. Queste differenze, oltre ad essere statisticamente significative, sono tanto marcate da rendere la discriminazione fra i diversi tessuti in base alla sola *stiffness* facilmente applicabile in ambito diagnostico. In particolare, una così marcata differenza tra il *core* del tumore, le zone necrotiche e il tessuto sano per quanto concerne il glioblastoma, nonché tra il meningioma e il tessuto sano, rappresenta un risultato sperimentale chiave in quanto apre la possibilità di identificare i tumori rispetto alla sostanza bianca con estrema precisione, utilizzando un parametro quantitativo.

L'individuazione del margine del tumore è un problema aperto in chirurgia ed è particolarmente rilevante nel caso del glioblastoma, a causa del *pattern* di infiltrazione peculiare delle cellule neoplastiche di quest'ultimo. Questi risultati sono di estremo interesse in quanto aprono la strada allo sviluppo di nuove strategie di individuazione intraoperatoria del margine tumorale attraverso la misura del modulo elastico dei tessuti incontrati.

In Figura 6.2 si osserva per l'isteresi media un *pattern* inverso rispetto a quello emerso per la *stiffness*, con la necrosi caratterizzata da un comportamento altamente viscoso (0.76 ± 0.06 ; oltre il 75% dell'energia di indentazione dissipata durante il processo di deformazione), il *core* del glioblastoma (0.47 ± 0.07) e il meningioma (0.41 ± 0.06) che presentano un comportamento relativamente più elastico, e il tessuto sano (0.55 ± 0.09) che, nuovamente, si posiziona a valori intermedi fra questi due estremi, con un comportamento viscoelastico.

L'isteresi mostra un chiaro *pattern* in dipendenza dal tipo di tessuto analizzato. Tale risultato avvalorava il ruolo dell'isteresi come marker biomeccanico di assoluto interesse, da associare al modulo Young - solitamente unico parametro considerato negli esperimenti di biomeccanica dei tessuti - al fine di ottenere una più accurata discriminazione diagnostica dei tumori cerebrali rispetto alla sostanza sana e delle componenti strutturali che li contraddistinguono.

Riteniamo che nella caratterizzazione biomeccanica dei tumori cerebrali non debba essere tralasciata la valutazione del parametro isteresi. La matrice extracellulare cerebrale è ricca in glicosaminoglicani, principali responsabili di risposte marcatamente viscoelastiche. Pertanto, studi delle proprietà biomeccaniche in questo distretto anatomico non dovrebbero prescindere da una valutazione quantitativa delle risposte viscoelastiche caratteristiche di tali molecole. Questo è ancor più vero quando si fa specificamente riferimento al glioblastoma i cui stimoli biomeccanici di sviluppo e diffusione dipendono fortemente dalla presenza e sovra-espressione di acido ialuronico.

Da una disamina complessiva dei dati ricavati da questo studio emerge che la caratterizzazione biomeccanica combinata, ottenuta grazie all'identificazione delle proprietà sia di *stiffness* sia di isteresi, permette di identificare e validare nuovi marker biomeccanici specifici per il GBM e per il meningioma, rispetto alla sostanza bianca sana. Tali marker in futuro potrebbero fornire utili informazioni al neurochirurgo direttamente in sala operatoria al fine di ottimizzare il volume di asportazione tumorale, preservando il parenchima cerebrale sano. I dati rilevati dalle misure del lavoro di adesione sono in accordo con i valori di isteresi riscontrati e completano la caratterizzazione biomeccanica dei tumori cerebrali studiati: i tumori esaminati presentano valori di adesione significativamente superiori rispetto a quelli rilevati per la sostanza bianca sana (Fig. 5.25), con la necrosi che in assoluto presenta maggiore valore di adesione rispetto a tutti i tessuti esaminati (Fig. 5.25 a).

6.2 Glioblastoma e meningioma, sviluppo e diffusione: microambienti extracellulari a confronto

Le differenze di comportamento biomeccanico dei diversi tessuti riassunte nelle Figure 6.1 e 6.2 sono estremamente rilevanti, rispecchiando una diversità non solo in termini puramente quantitativi, ma di composizione e struttura dei diversi tessuti.

Sebbene i valori medi di *stiffness* trovati siano simili per il *core* del glioblastoma e per il meningioma, a questo risultato si arriva da distribuzioni di valori di modulo di Young dalle caratteristiche molto diverse fra loro. Infatti, se da una parte il meningioma si comporta in maniera relativamente più omogenea, con un istogramma tipicamente unimodale che copre approssimativamente una regione di valori di *stiffness* associabile alla presenza di proteine fibrose (Fig. 5.16, curve 1,2,3,4), dall'altra il *core* del glioblastoma mostra una distribuzione "a coda lunga" (si veda ad esempio Fig. 5.4 q), fortemente asimmetrica, in cui un relevantissimo contributo di valori di *stiffness* molto bassi, compatibili con una diffusa presenza di componenti cellulari "soffici", viene controbilanciato da una significativa componente ad altissimi valori (da diverse decine ad alcune centinaia di kPa); dunque, se per il meningioma il valore medio di *stiffness* si può dire rappresentativo del comportamento tipico del tessuto, ciò non vale per il glioblastoma, che può essere invece visto come il risultato di una dinamica infiltrativa in atto, in cui diverse componenti, rappresentative di diversi stadi di evoluzione, convivono.

L'eterogeneità del *core* del glioblastoma è immediatamente apprezzabile dall'osservazione delle mappe di *stiffness*. Nelle mappe relative alle regioni del *core* del glioblastoma (Fig. 5.4 i-n) sono identificabili sia strutture morbide, con bassa *stiffness* (20-1000 Pa), sia strutture rigide, caratterizzate da moduli di Young che variano da pochi kPa fino a 10^5 Pa. Questo risultato conferma che il *core* del tumore è un tessuto dalla complessa organizzazione, costituito da molteplici strutture con risposte biomeccaniche differenti, quali cellule, acido ialuronico e proteine fibrose del distretto perivascolare. Al contrario, le mappe di *stiffness* relative alle regioni necrotiche mostrano una distribuzione piuttosto omogenea, senza una chiara strutturazione spaziale; nella necrosi non sono identificabili strutture diverse fra loro e, in particolare, non sono presenti le strutture caratterizzate da alti valori di E, né le strutture caratterizzate da valori di E nell'intervallo compreso tra ~ 1 e ~ 30 KPa (Fig. 5.4 a-d), in perfetto accordo con la sovra-espressione rispettivamente delle MMP^{29,306,307} e delle ialuronidasi in queste regioni.

Le mappe relative ai meningiomi (Fig. 5.13 a,b) mostrano valori di E compresi nell'intervallo tra ~ 100 Pa e $\sim 2 \times 10^5$ Pa. Tuttavia è chiaramente apprezzabile una maggiore rappresentazione delle aree a valori di ~ 20 kPa (si veda ad esempio Fig. 5.13 a) compatibili con l'espressione di proteine fibrose, rispetto ad una minima rappresentazione di aree a bassi valori di *stiffness*. Questo intervallo di valori mostra che il meningioma presenta una maggiore rigidità meccanica rispetto al glioblastoma, sia relativamente al *core* sia alla necrosi di GBM. Questi riscontri sono perfettamente in accordo con il differente microambiente extracellulare in cui si sviluppano i due tumori.

Il glioblastoma possiede un tropismo specifico per il parenchima cerebrale. È noto che nel cervello normale i livelli di proteine fibrose sono estremamente bassi in confronto con quelli osservati in tessuti connettivi al di fuori del sistema nervoso centrale. La matrice extracellulare cerebrale è prevalentemente costituita da glicosaminoglicani quale l'acido ialuronico e proteoglicani. Come conseguenza di questa peculiare struttura, il tessuto cerebrale è molto più morbido rispetto agli altri tessuti, con un modulo elastico di Young medio intorno a 1 kPa.^{30,31} Diversi studi hanno dimostrato che l'acido ialuronico crea un microambiente che facilita la migrazione, la proliferazione, la sopravvivenza e l'invasione delle cellule di glioblastoma.³²⁻³⁴ Proprio per questo, le cellule di glioma producono costitutivamente acido ialuronico e la sua produzione risulta incrementata durante la proliferazione cellulare,³⁵ promuovendo l'invasione del glioma.³⁶ La sovra-espressione

dell'acido ialuronico nel GBM rispetto all'encefalo normale è stata confermata anche in questo studio, sia dai risultati AFM sia dalle indagini istochimiche eseguite (Fig. 5.8). Studi di letteratura hanno, però, anche dimostrato che le cellule di glioblastoma, nel contesto di questa matrice viscosa, utilizzano strutture ad alta rigidità per diffondere più velocemente. Strutture quali la membrana basale dei vasi sanguigni e i tratti di fibre mieliniche della sostanza bianca, a causa della loro rigidità meccanica, vengono utilizzate come percorso infiltrativo per l'invasione del glioma.^{37,38} Per sfruttare la rigidità meccanica delle pareti vasali necessaria alla loro diffusione, è noto che le cellule di glioblastoma favoriscono la neo-angiogenesi.³⁹ Pertanto, le cellule di glioblastoma possiedono la capacità di rimodellare attivamente il microambiente cerebrale incrementando l'espressione di acido ialuronico, degradando proteoliticamente la matrice extracellulare del parenchima cerebrale sano e inducendo la neo-angiogenesi; modificando così la matrice extracellulare normale con un'aumentata espressione di collagene e fibronectina, prevalentemente associate al distretto perivascolare.³⁷ Quanto descritto sulle relazioni che intercorrono fra GBM e matrice extracellulare è in accordo con la complessa organizzazione del *core* di GBM rilevata alle indagini AFM in cui è possibile identificare molteplici strutture con risposte biomeccaniche differenti, quali cellule, acido ialuronico e proteine fibrose del distretto perivascolare.

Il meningioma è un tumore extra-assiale in cui possiamo riconoscere un prevalente tropismo per le meningi encefaliche e, di conseguenza, possiamo aspettarci rispetto al GBM una diversa composizione della matrice extracellulare in cui si sviluppa, che sottintende un differente meccanismo di accrescimento e diffusione. Laddove studi sul potenziale invasivo dei gliomi in relazione alle alterazioni della matrice extracellulare sono ben documentati,^{42,43} non altrettanto si può dire per i meningiomi, per i quali sono riportati in letteratura limitati lavori al riguardo.⁴⁴ I principali fattori noti responsabili del rimodellamento del microambiente extracellulare che favorisce lo sviluppo del meningioma sono l'espressione da parte di questi tumori di elevati livelli di proteasi in grado di degradare la matrice extracellulare⁴⁶ e la loro capacità di elaborare proteine fibrose della matrice extracellulare.⁴⁵ La sovra-espressione di proteine fibrose, principale funzione di derivazione mesenchimale delle cellule di meningioma,⁴⁵ è in accordo con la maggiore omogenea rappresentazione nelle mappe di *stiffness* di aree a valori di *E* compatibili con l'espressione di proteine fibrose, nonché con il fatto che il valore medio di *stiffness* per i meningiomi sia rappresentativo del comportamento tipico dell'intero tessuto. I meningiomi digeriscono la matrice extracellulare sul fronte d'invasione per accrescersi e contemporaneamente producono proteine fibrose all'interno della massa tumorale. L'assenza del contributo a poche centinaia di Pa può essere attribuita a due ipotesi. Le cellule di meningioma potrebbero essere più dure rispetto ai valori di *stiffness* riportati in letteratura per altre tipologie di cellule tumorali, tuttavia ad oggi non è possibile validare questa ipotesi perché non sono note caratterizzazioni AFM di meningiomi né di cellule di meningioma in letteratura. In alternativa, riteniamo più probabile che le cellule di meningioma siano imbrigliate in una rete connettivale in cui non è possibile distinguere con chiarezza la componente fibrosa da quella cellulare. Questa propensione del meningioma a crescere in un contesto omogeneamente rigido non è stata descritta in letteratura. Ciò che è noto è che cellule di glioblastoma poste in un contesto altrettanto rigido non sono in grado di diffondere. Sebbene numerosi studi sull'espansione del glioblastoma effettuati utilizzando *scaffold* biomimetici bidimensionali abbiano dimostrato che un incremento nella rigidità della matrice extracellulare provoca un aumento della proliferazione, della motilità e della diffusione delle cellule neoplastiche,^{37,40} studi su *scaffold* biomimetici tridimensionali, hanno dimostrato che all'aumentare della rigidità degli *scaffold* 3D, composti da fitte *mesh* tridimensionali di proteine fibrose quali collagene o fibronectina, si assiste ad una progressiva diminuzione che culmina in un'interruzione del processo di espansione del tumore; ciò conferma che nei modelli di matrice extracellulare cerebrale tridimensionali il glioblastoma necessita per le sue funzioni della presenza di acido ialuronico e di un ambiente viscoso, oltre che di componenti rigide.^{305,313} Sugeriamo che la propensione del meningioma a crescere in

un microambiente rigido possa essere alla base dei suoi bersagli d'infiltrazione, ben distinti da quelli del glioblastoma. Nei meningiomi più aggressivi (gradi II e III WHO), con tendenza alla recidiva neoplastica dopo asportazione chirurgica e all'invasione, è nota la propensione ad infiltrare prevalentemente strutture rigide quali la dura madre e l'osso.⁴⁷⁻⁴⁹ I dati suggeriscono pertanto che la modalità di sviluppo e infiltrazione dei gliomi sia legata principalmente alla loro continua ricerca di strutture ad elevata *stiffness*: questi tumori inseguono la rigidità della sostanza bianca e dei vasi e vi si insinuano, in una matrice di acido ialuronico altamente viscosa, potendo dare origine a focolai multicentrici in zone distanti del cervello; al contrario, i meningiomi, dotati di intrinseche proprietà simil-fibroblastiche, si circondano autonomamente di una matrice extracellulare fibrosa e si accrescono all'interno di questo contesto rigido, senza necessità di diffondere e infiltrare il parenchima cerebrale.

È stata discussa in senso generale l'efficacia della caratterizzazione biomeccanica tramite AFM nel distinguere fra loro i tessuti esaminati. Tali considerazioni sono di estrema importanza, soprattutto se inserite in un contesto futuro in cui sia possibile discriminare intraoperatoriamente con strumentazioni *ad hoc* le lesioni dal parenchima sano. Volendo ora discutere più specificamente alcuni risultati emersi dallo studio, è utile porre l'accento sull'identificazione biomeccanica di quelle strutture o "condizioni tissutali" la cui identificazione possa, nella stessa ottica futura, essere sfruttata come supporto diagnostico intraoperatorio nella pratica neurochirurgica di identificazione, dissezione e asportazione tumorale.

Per quanto concerne i tumori di natura gliale, è nota l'importanza di identificare aree di necrosi e di proliferazione vascolare per stabilire il *grading* tumorale. Queste componenti rappresentano infatti due dei principali *hallmark* dei gliomi di IV grado. È stato dimostrato che il valor medio e la distribuzione di E ed H sono estremamente sensibili alla presenza di questi *hallmark* del glioblastoma.

6.3 *Fingerprint* della necrosi nel glioblastoma

La Figura 6.1 mostra che il valor medio di modulo di Young per la necrosi è dell'ordine di 300 Pa. Tale valore è estremamente basso se comparato con i valori medi degli altri tessuti analizzati, e con il valore riscontrato per gli astrociti sani in esperimenti in vitro su colture cellulari. La presenza di picchi a bassa *stiffness* è una caratteristica peculiare dei tumori altamente aggressivi e può essere correlata sia a regioni necrotiche sia a cellule tumorali soffici. Recentemente Plodinec et al. hanno riportato un picco di modulo di Young del valore di 0.57 ± 0.16 kPa per cellule di carcinoma mammario.²² Pertanto, il valore di modulo di Young del tessuto necrotico emerso da questo studio è significativamente più basso rispetto ai valori riportati in letteratura per le cellule neoplastiche.

Al basso valore di modulo di Young si accompagna un valore di isteresi estremamente elevato (0.75) rispetto a quello dei restanti tessuti analizzati. Questo dato conferma che le forze dissipative viscosse giocano un ruolo importante nel determinare la risposta meccanica della necrosi e che questa non si comporta come un corpo perfettamente elastico ma, piuttosto, mostra un comportamento prevalentemente viscoso, in accordo con la sua composizione priva in proteine fibrose e costituita prevalentemente da cellule morte, detriti cellulari e prodotti di degradazione. L'adesione rilevata per il tessuto necrotico presenta anch'essa i più alti valori riscontrati (1.5×10^{-15} J \pm 1.0×10^{-15} J) rispetto agli altri tessuti.

Inoltre l'assenza di una strutturazione del tessuto, evidente dall'aspetto omogeneo delle mappe come già discusso, è ulteriormente confermata dagli andamenti del modulo di Young in funzione del *rate* di indentazione (Fig. 5.10 a-c) che evidenziano una variazione omogenea del tessuto al variare della dinamica di indentazione.

Tutti questi risultati sperimentali confermano, in accordo con gli esami istologici, l'attribuzione delle mappe in Figura 5.4 a-d a tessuti necrotici, e la possibilità di discriminare queste regioni in base alle proprietà meccaniche identificate, caratteristiche della necrosi.

La caratterizzazione biomeccanica della necrosi potrebbe trovare applicazione futura di grande interesse in ambito chirurgico, basti considerare ad esempio l'importanza durante prelievi biotipici eseguiti ai fini diagnostici di non cadere su aree necrotiche.

6.4 *Fingerprint* della neo-angiogenesi nel glioblastoma

Per quanto concerne la neo-angiogenesi associata al glioblastoma, lo studio delle distribuzioni di frequenza del *core* del tumore consente di identificare un contributo relativo a strutture con elevata rigidità meccanica (fino a 100 kPa); mediante un sistematico confronto con le istologie, tali strutture ad alta rigidità possono essere associate alla presenza di una vascolarizzazione anomala, marker diagnostico del GBM.

La presenza di fenomeni di angiogenesi che danno luogo ad una proliferazione anomala di vasi si riflette nel valor medio dell'isteresi. I vasi neoformati sono, infatti, caratterizzati da una elevata rappresentazione di strutture fibrose dotate di un comportamento puramente elastico. Tali componenti determinano un valore medio dell'isteresi di circa 0.45, nettamente inferiore rispetto a quello del tessuto sano che risulta di circa 0.6 e di quello dei tessuti necrotici che è di circa 0.75. Questi risultati confermano le potenzialità dell'utilizzo combinato del modulo di Young e dell'isteresi nell'identificazione di marker biomeccanici più accurati rispetto a quelli sviluppati tramite l'utilizzo del solo modulo di Young: il riscontro di strutture ad elevata rigidità con bassa isteresi caratterizza la vascolarizzazione anomala nel glioblastoma.

Per quanto concerne il meningioma, fra i marker più significativi applicabili in ambito neurochirurgico, discutiamo quelli che hanno permesso di indentificare chiaramente zone di dura madre infiltrata da cellule meningoteliali neoplastiche, e quelli che hanno reso possibile discriminare i meningiomi di grado II dai meningiomi di grado I.

6.5 *Fingerprint* della dura madre infiltrata

La dura madre infiltrata da cellule neoplastiche manifesta un *pattern* di *stiffness* estremamente caratteristico, evidenziabile alla mappa di modulo di Young (Fig. 5.13 c). La mappa mostra, nel complesso, aree con maggiore rigidità rispetto alle mappe dei meningiomi (Fig. 5.13 a,b); in particolare, il dato interessante è fornito dalla possibilità di identificare due regioni differenti ben delineate e chiaramente distinguibili che mostrano una risposta elastica significativamente differente: una regione più rigida, con valori di E comparabili a quelli delle fibre collagene, e una regione più morbida, caratterizzata da un comportamento meccanico simile a quello riscontrato nei meningiomi. Interpretando i dati riteniamo che l'area a maggior rigidità caratterizzi la dura madre sana, l'altra regione deve la sua minore rigidità alla presenza di cellule di meningioma nella dura, costituendo così il *fingerprint* biomeccanico della dura madre infiltrata. Le distribuzioni di frequenza dei valori di modulo di Young relative ai tessuti di dura madre infiltrata (Fig. 5.16, curve 5,6) mostrano, in accordo con quanto osservato dall'analisi delle mappe, una *stiffness* maggiore rispetto ai meningiomi (Fig. 5.16, curve 1-4), con un picco centrato intorno a 6×10^6 Pa, legato all'elevata presenza di fibre connettivali. Le distribuzioni si presentano, però, altamente asimmetriche con una pronunciata coda a bassi valori di E che occupa specificamente l'intervallo di valori delle distribuzioni dei meningiomi, evidenziabile con l'elevata sovrapposizione grafica delle code delle curve di dura madre infiltrata (curve 5,6) e delle distribuzioni dei meningiomi (curve 1-4); le sovrapposizioni sono da attribuire alla presenza di cellule neoplastiche nel tessuto durale.

Considerando anche i dati emersi dallo studio delle risposte viscoelastiche, questi risultati, come confermato dai riscontri istologici (Fig. 5.15), identificano marker che permettono di distinguere la dura madre sana, ricca in fibre elastiche che le conferiscono valori di isteresi inferiori rispetto a quelli dei meningiomi, dalla dura madre infiltrata, con valori di isteresi maggiori, attribuibili alla componente cellulare.

Pertanto, la caratterizzazione biomeccanica di queste strutture ha permesso di rilevare la sede di transizione meningioma/dura infiltrata/dura sana e di identificare il *fingerprint* del “fronte di infiltrazione” di cellule tumorali di meningioma all’interno della dura madre (Fig. 5.15 a). È importante sottolineare che il comportamento meccanico della dura madre e delle regioni durali sede di infiltrazione è estremamente differente, pertanto l’utilizzo dell’AFM non lascia dubbi nella localizzazione di queste ultime. Tali riscontri sono di estremo interesse se considerati nella prospettiva di un’applicazione chirurgica futura, permettendo di identificare aree di dura madre infiltrata non apprezzabili macroscopicamente e, ove possibile, di optare per una resezione radicale al fine di ridurre significativamente il tasso di recidiva.

6.6 *Fingerprint* dei meningiomi di grado II

I meningiomi di grado I presentano una rigidità decisamente aumentata rispetto agli altri tessuti studiati e anche rispetto ad altre tipologie tumorali recentemente caratterizzate via AFM, quali il carcinoma mammario e l’epatocarcinoma.^{22,27} Come descritto, tale rigidità è da attribuire alla sovra-espressione di proteine fibrose, responsabili di una risposta relativamente più elastica che giustifica il basso valore di isteresi che caratterizza questi tumori. I meningiomi di grado II mostrano, rispetto a quelli di grado I, un comportamento biomeccanico nettamente differente che dipende dal differente rapporto cellule-matrice extracellulare che li caratterizza e di cui le indagini istologiche e istochimiche hanno dato conferma (Fig. 5.24). La mappa di modulo di Young dei meningiomi di grado II (Fig. 5.23 a) evidenzia una netta ed omogenea diminuzione del valore medio di E rispetto alle mappe rappresentative dei meningiomi di grado I (Fig. 5.13 a,b).

La Figura 6.3 mostra i valori medi del modulo elastico di Young (E) su tutti i campioni esaminati di meningiomi di grado I e di grado II. Risulta immediatamente evidente come i meningiomi di grado I (13900 ± 5200 Pa) presentino una rigidità estremamente aumentata rispetto ai meningiomi di grado II (400 ± 240 Pa), di circa due ordini di grandezza maggiore.

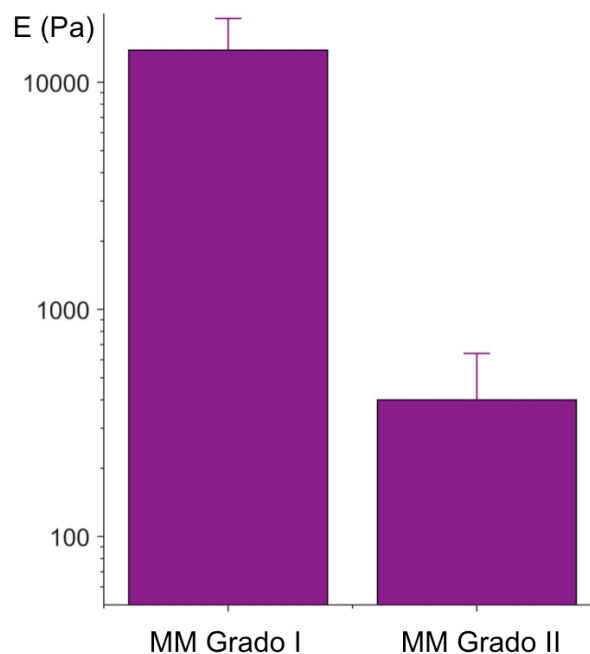


Fig. 6.3 Valori medi del modulo elastico di Young (E) sui tessuti esaminati di meningiomi (MM) di grado I e di grado II.

La ridotta rigidità dei meningiomi di grado II è da attribuire ad un'ipercellularità caratteristica di questi tumori essendo, per altro, i valori di *stiffness* osservati intorno a qualche centinaio di Pa compatibili con quelli tipici di una risposta di natura cellulare. È importante porre l'accento sul fatto che, l'identificazione di questi dati compatibili con valori cellulari, ci permette di avvalorare l'ipotesi secondo cui nei meningiomi di grado I il contributo cellulare non è apprezzabile perché le cellule sono inserite nel contesto di una fitta trama connettivale, tale da non permetterne una chiara identificazione rispetto alle componenti fibrose.

L'aumentata cellularità si accompagna ad una scarsa rappresentazione delle componenti fibrose della matrice extracellulare, conseguente ad una sovra-espressione delle metalloproteasi non controbilanciata dall'espressione dei loro inibitori. L'assenza di strutture fibrose associata ad un aumento della componente cellulare è responsabile dell'elevato grado di isteresi riscontrato nei meningiomi di grado II. La Figura 6.4 mostra i valori medi di isteresi su tutti i campioni esaminati di meningiomi di grado I e di grado II.

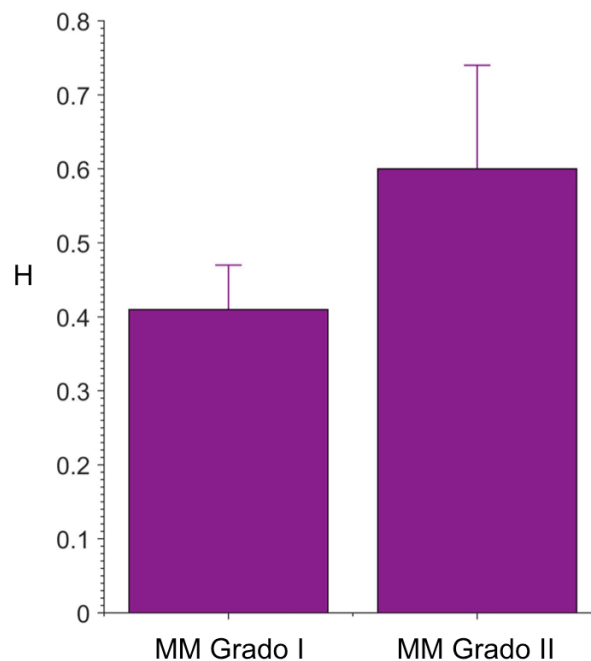


Fig. 6.4 Valori medi di isteresi sui tessuti esaminati di meningiomi (MM) di grado I e di grado II.

Risulta evidente l'aumentata isteresi dei meningiomi di grado II, caratterizzati da un comportamento prevalentemente viscoso, rispetto a quella dei meningiomi di grado I che mostrano piuttosto un comportamento viscoelastico, legato ad una maggior rappresentazione delle componenti fibrose a risposta prevalentemente elastica.

Nella valutazione di un meningioma, l'individuazione di bassi valori di *stiffness* in presenza di alti valori di isteresi costituisce un marker per l'identificazione di una lesione di grado II.

Tale considerazione è estremamente importante ai fini dello sviluppo di nuove applicazioni cliniche basate sull'utilizzo di AFM intraoperatori, specialmente per quanto concerne lo *staging* del tumore in fase operatoria. A tale proposito, ricordiamo che l'analisi biomeccanica dei tessuti mediante AFM si esegue senza la necessità di preparare o fissare il campione, pertanto in futuro potrebbe essere utilizzata per la valutazione del grado di malignità del tumore direttamente in fase intraoperatoria.

Tutte le alterazioni biomeccaniche della matrice extracellulare, correlate a loro volta con modifiche delle caratteristiche biomeccaniche del meningioma, sono risultate maggiori nelle forme atipiche rispetto a quelle benigne,⁴⁶ pertanto riteniamo importante poter individuare

intra-operatoriamente caratteristiche che si associano ad una maggiore aggressività della neoplasia, per consentirne una asportazione più radicale già al primo intervento.

6.7 Considerazioni e prospettive future

Lo sviluppo di tecnologie innovative fondate su nuove scoperte scientifiche, spesso si è dimostrato un valido ausilio in ambito chirurgico. Nella pratica neurochirurgica moderna molte sono le tecnologie che possono affiancare l'operatore nel corso dell'asportazione di tumori cerebrali. Alcune di queste strumentazioni sono ormai utilizzate di *routine* nella pratica della rimozione tumorale. La caratteristica comune di questi ausili tecnologici è quella di permettere una migliore e più sicura discriminazione del tessuto patologico rispetto al tessuto sano. È evidente che in un distretto anatomico come quello cerebrale sia di notevole aiuto poter distinguere con sicurezza la lesione tumorale dal parenchima sano circostante, in considerazione dei deficit neurologici che, come è noto, possono conseguire all'asportazione di aree cerebrali nobili. Fra le tecnologie entrate ormai a far parte della pratica neurochirurgica moderna, ricordiamo l'uso del neuronavigatore intraoperatorio che sfrutta le immagini di risonanza magnetica preoperatorie per guidare il chirurgo durante l'asportazione. Tuttavia, è noto che procedendo intra-operatoriamente con il drenaggio del liquido cefalorachidiano e con l'asportazione del tumore si induce una alterazione del profilo cerebrale rispetto alle condizioni pre-operatorie (*shift* cerebrale, collasso di regioni precedentemente sotto tensione) che rende inaccurata ed imprecisa la navigazione basata sulle immagini pre-operatorie.³¹⁴⁻³¹⁹

Molte delle strumentazioni utilizzate in neurochirurgia si basano proprio sulle proprietà biomeccaniche dei tumori cerebrali. Unsgaard et al. hanno dimostrato l'efficacia dell'ecografo 3D nel fornire immagini intraoperatorie delle lesioni cerebrali rispetto al parenchima sano durante le varie fasi della procedura di asportazione, ovviando ai limiti del neuronavigatore.³²⁰ È esperienza comune per il neurochirurgo che il tumore cerebrale presenti una consistenza aumentata rispetto al parenchima circostante;³⁰⁸ questa maggior rigidità è avvalorata dall'efficacia dell'ecografo tridimensionale nel guidare la resezione chirurgica dei tumori cerebrali.^{37,320} Questa tecnica di *imaging* intraoperatoria basata sugli ultrasuoni sfrutta le proprietà meccaniche dei tessuti da identificare, così come il semplice ecografo bidimensionale, spesso impiegato nell'identificazione intraoperatoria delle lesioni cerebrali pediatriche. Le caratterizzazioni biomeccaniche validate nel corso di questo studio sono in perfetto accordo con l'esperienza pratica neurochirurgica e forniscono le prime misure quantitative delle proprietà meccaniche sia del principale tumore maligno cerebrale, sia del principale tumore benigno, sia della sostanza bianca normale. Le caratterizzazioni quantitative rilevate possono essere utilizzate per impostare parametri numerici specifici e migliorare così la selettività, l'affidabilità e l'efficacia di ecografi di questo tipo o di altre strumentazioni che basano la loro efficacia sulle proprietà biomeccaniche dei tessuti cerebrali patologici e normali.

Infatti, le proprietà biomeccaniche dei tessuti cerebrali non sono solo alla base dello sviluppo di tecniche di *imaging*, ma hanno permesso anche di realizzare una specifica strumentazione microchirurgica per l'asportazione selettiva delle neoformazioni cerebrali. Fra questi strumenti ricordiamo gli aspiratori ad ultrasuoni che, sfruttando le risposte biomeccaniche dei tessuti cerebrali, possono essere modulati per frantumare e aspirare alcuni tessuti lasciandone integri degli altri, dalle proprietà meccaniche differenti. La selettività degli aspiratori ad ultrasuoni può essere regolata selezionando il *range* di cavitazione in relazione alla consistenza tissutale. In questo modo è possibile "aggredire" sia tessuti molli sia tessuti dalla consistenza calcifica; i detriti prodotti dalla frammentazione ultrasonica vengono poi aspirati. In neurochirurgia sono solitamente utilizzati aspiratori ad ultrasuoni differenti, modulati per tessuti dalle differenti consistenze. A tal proposito alcuni aspiratori sono dotati della funzione *Tissue select* che consente di ottimizzare la selettività tissutale inserendo delle micropause e riducendo la potenza delle vibrazioni per massimizzare l'azione sul parenchima

minimizzando l'azione su strutture delicate quali vasi e nervi (CUSA Excel Integra); altri sono specificamente regolati per avere una selettività per il tessuto osseo, questi aspiratori emulsionano l'osso preservando il parenchima cerebrale (Sonopet Stryker).

Va da sé l'importanza di poter sfruttare i parametri di rigidità tissutale validati con questo studio in applicazioni cliniche. A tal proposito ricordiamo che nel corso della caratterizzazione dei meningiomi è stato possibile identificare il *fingerprint* biomeccanico delle strutture vorticosi e rilevare come “vuoto di segnale” la presenza dei corpi psammomatosi, strutture la cui presenza conferisce rigidità aumentata al tessuto da asportare. Conoscere la consistenza del tumore durante la sua asportazione è di estrema importanza e condiziona, come è noto, la procedura e i tempi della resezione chirurgica.

Nella pratica neurochirurgica è, inoltre, comunemente apprezzabile la maggiore adesività del tessuto patologico rispetto alla materia sana. È noto che la maggiore adesività delle cellule neoplastiche conferisce loro capacità di diffusione, rendendole in grado di aderire meglio alle cellule endoteliali attivate e alla matrice extracellulare. Tali cellule mostrano una maggiore sopravvivenza e resistenza all'apoptosi, e la loro presenza è associata allo sviluppo di recidive tumorali.⁴⁶ Differenze nelle caratteristiche di adesione dei tumori cerebrali possono influenzare l'asportazione chirurgica delle lesioni, potendola rendere più o meno agevole a seconda che la neoplasia si presenti rispettivamente più o meno adesiva. La valutazione dell'adesione aspecifica misurata in questo studio (la misura dell'adesione specifica tramite AFM prevede la funzionalizzazione della punta dello strumento con anticorpi specifici) è quella meglio rappresentativa dei fenomeni di adesione che possono verificarsi tra i tessuti e gli strumenti chirurgici.

Disporre di un AFM intraoperatorio che fornisca in diretta informazioni sulla *stiffness* e sulle proprietà viscoelastiche dei tessuti, associato ad uno strumentario *ad hoc* per l'asportazione tumorale che si basi sui parametri quantitativi forniti, potrebbe rivelarsi di notevole ausilio. Infatti, essendo questa la prima caratterizzazione biomeccanica dei tessuti cerebrali riportata in letteratura, i *fingerprint* identificati potrebbero essere sfruttati per impostare con più precisione ed efficacia i parametri di selettività tissutale sia in strumenti già esistenti sia in nuovi strumentari dedicati, da utilizzare nella pratica neurochirurgica.

Considerando che gli strumenti a disposizione, una volta introdotti nella pratica neurochirurgica, sono presto divenuti indispensabili componenti dello strumentario microchirurgico, è lecito pensare che altri strumenti in grado di discriminare efficacemente differenti tipologie di tessuti cerebrali possano entrare a far parte della strumentazione neurochirurgica.

Sebbene il microscopio a forza atomica utilizzato per condurre questo studio non sia stato concepito come strumento da utilizzare in sede intraoperatoria, tutte le principali case produttrici di AFM hanno immesso sul mercato anche AFM ultrarapidi che permetterebbero la misurazione intraoperatoria in tempi compatibili con le procedure neurochirurgiche.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento sincero va al Dott. Gabriele Ciasca, amico e collega, con cui è stato ideato e realizzato questo progetto e senza cui non sarebbe stato possibile portare a termine lo studio. Lo stimolante lavoro di cooperazione ha consentito una più profonda interpretazione dei risultati emersi; l'integrazione reciproca dei rispettivi ambiti di interesse ci ha portato ad immergerci nella "biofisica della neurochirurgia", alla scoperta di una nuova interessante realtà.

Ringrazio sentitamente anche la Dott.ssa Manila Antonelli per la sua disponibilità e gentile collaborazione. Il suo supporto nell'analisi e nella comprensione dei preparati anatomicopatologici è stato sostanziale.

Ringrazio con affetto il Prof. Roberto Delfini per avermi appoggiata nell'intraprendere questa ricerca, per la fiducia concessami e per la libertà con cui mi ha permesso di condurre lo studio. A lui vanno la mia stima e la mia riconoscenza.

Al Prof. Felice Giangaspero vanno i miei ringraziamenti per aver messo a nostra completa disposizione il suo dipartimento e la sua esperienza.

Ai miei cari genitori voglio dire grazie per avermi sempre sostenuta e per l'emozione che leggo nei loro occhi al raggiungimento di ogni mio traguardo. Sapervi fieri e felici mi riempie di gioia.

Guido, grazie per avermi supportata e incoraggiata, per l'infinita pazienza che mi hai dimostrato e per avermi accompagnato in ogni fase di questo percorso. La tua comprensione e le costanti manifestazioni d'amore mi hanno portato con fermezza al raggiungimento di questo obiettivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. 2005;8(3):241-254. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.010.
2. DuFort CC, Paszek MJ, Weaver VM. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(5):308-319. doi:10.1038/nrm3112.
3. Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(1):75-82. doi:10.1038/nrm2594.
4. Wozniak MA, Chen CS. Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(1):34-43. doi:10.1038/nrm2592.
5. Katira P, Bonnecaze RT, Zaman MH. Modeling the mechanics of cancer: effect of changes in cellular and extra-cellular mechanical properties. *Front Oncol*. 2013;3:145. doi:10.3389/fonc.2013.00145.
6. Lelièvre SA, Weaver VM, Nickerson JA, et al. Tissue phenotype depends on reciprocal interactions between the extracellular matrix and the structural organization of the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14711-14716. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24514&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 12, 2016.
7. Kirmizis D, Logothetidis S. Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:137-145. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2865008&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 10, 2016.
8. Guck J, Schinkinger S, Lincoln B, et al. Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophys J*. 2005;88(5):3689-3698. doi:10.1529/biophysj.104.045476.
9. Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater*. 2007;3(4):413-438. doi:10.1016/j.actbio.2007.04.002.
10. Fuhrmann A, Staunton JR, Nandakumar V, Banyai N, Davies PCW, Ros R. AFM stiffness nanotomography of normal, metaplastic and dysplastic human esophageal cells. *Phys Biol*. 2011;8(1):015007. doi:10.1088/1478-3975/8/1/015007.
11. Lekka M, Laidler P, Gil D, Lekki J, Stachura Z, Hryniewicz AZ. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur Biophys J*. 1999;28(4):312-316. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10394623>. Accessed February 12, 2016.
12. Lekka M. Discrimination between normal and cancerous cells using AFM. *Bionanoscience*. January 2016:1-16. doi:10.1007/s12668-016-0191-3.
13. Rother J, Nöding H, Mey I, Janshoff A. Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines. *Open Biol*. 2014;4(5):140046. doi:10.1098/rsob.140046.
14. Cross SE, Jin Y-S, Rao J, Gimzewski JK. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol*. 2007;2(12):780-783. doi:10.1038/nnano.2007.388.
15. Li QS, Lee GYH, Ong CN, Lim CT. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(4):609-613. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.078.
16. Xu W, Mezencev R, Kim B, Wang L, McDonald J, Sulchek T. Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(10):e46609. doi:10.1371/journal.pone.0046609.
17. Palmieri V, Lucchetti D, Maiorana A, et al. Biomechanical investigation of colorectal cancer cells. *Appl Phys Lett*. 2014;105(12):123701. doi:10.1063/1.4896161.
18. Rebelo LM, de Sousa JS, Mendes Filho J, Radmacher M. Comparison of the

- viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. *Nanotechnology*. 2013;24(5):055102. doi:10.1088/0957-4484/24/5/055102.
19. Cross SE, Jin Y-S, Tondre J, Wong R, Rao J, Gimzewski JK. AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology*. 2008;19(38):384003. doi:10.1088/0957-4484/19/38/384003.
20. Ramos JR, Pabijan J, Garcia R, Lekka M. The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process. *Beilstein J Nanotechnol*. 2014;5:447-457. doi:10.3762/bjnano.5.52.
21. Lekka M, Gil D, Pogoda K, et al. Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Arch Biochem Biophys*. 2012;518(2):151-156. doi:10.1016/j.abb.2011.12.013.
22. Plodinec M, Loparic M, Monnier CA, et al. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat Nanotechnol*. 2012;7(11):757-765. doi:10.1038/nnano.2012.167.
23. Nagelkerke A, Bussink J, Rowan AE, Span PN. The mechanical microenvironment in cancer: how physics affects tumours. *Semin Cancer Biol*. 2015;35:62-70. doi:10.1016/j.semcancer.2015.09.001.
24. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. 2012;196(4):395-406. doi:10.1083/jcb.201102147.
25. Zhao Y, Zhang TB, Bao CH, Chen XY, Wang Y, Wang Q. Physical properties of gastrointestinal stromal tumors based on atomic force microscope analysis. *Genet Mol Res*. 2013;12(4):5774-5785. doi:10.4238/2013.November.22.4.
26. Park S, Lee YJ. AFM-based dual nano-mechanical phenotypes for cancer metastasis. *J Biol Phys*. 2014;40(4):413-419. doi:10.1007/s10867-014-9353-0.
27. Tian M, Li Y, Liu W, et al. The nanomechanical signature of liver cancer tissues and its molecular origin. *Nanoscale*. 2015;7(30):12998-13010. doi:10.1039/c5nr02192h.
28. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*. 2015;17 Suppl 4(suppl_4):iv1-iv62. doi:10.1093/neuonc/nov189.
29. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(6):1046-1069. doi:10.1016/j.biocel.2004.01.013.
30. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(2):108-122. doi:10.1038/nrc2544.
31. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044.
32. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):528-539. doi:10.1038/nrc1391.
33. Sironen RK, Tammi M, Tammi R, Auvinen PK, Anttila M, Kosma VM. Hyaluronan in human malignancies. *Exp Cell Res*. 2011;317(4):383-391. doi:10.1016/j.yexcr.2010.11.017.
34. Toole BP. Hyaluronan-CD44 interactions in cancer: Paradoxes and possibilities. *Clin Cancer Res*. 2009;15(24):7462-7468. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0479.
35. Wiranowska M, Ladd S, Moscinski LC, et al. Modulation of hyaluronan production by CD44 positive glioma cells. *Int J Cancer*. 2010;127(3):532-542. doi:10.1002/ijc.25085.
36. Park JB, Kwak HJ, Lee SH. Role of hyaluronan in glioma invasion. *Cell Adh Migr*. 2008;2(3):202-207. doi:10.4161/cam.2.3.6320.
37. Ulrich TA, de Juan Pardo EM, Kumar S. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res*. 2009;69(10):4167-4174. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4859.
38. Lefranc F, Brotchi J, Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol*. 2005;23(10):2411-2422. doi:10.1200/JCO.2005.03.089.

39. Caffo M, Barresi V, Caruso G, et al. Gliomas Biology: Angiogenesis and Invasion. In: Terry Lichtor, ed. *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications*. InTech; 2013:37-103. doi:10.5772/53487.
40. Thomas TW, DiMilla PA. Spreading and motility of human glioblastoma cells on sheets of silicone rubber depend on substratum compliance. *Med Biol Eng Comput*. 2000;38(3):360-370. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10912355>. Accessed February 12, 2016.
41. Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME. Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(4):458-478. doi:10.1007/s00018-007-6342-5.
42. Pilkington GJ. The role of the extracellular matrix in neoplastic glial invasion of the nervous system. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(9):1159-1172. 9181059.
43. Koochekpour S, Merzak A, Pilkington GJ. Extracellular matrix proteins inhibit proliferation, upregulate migration and induce morphological changes in human glioma cell lines. *Eur J Cancer*. 1995;31A(3):375-380. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540403>.
44. Rooprai HK, Liyanage K, Robinson SFD, Kandaneeratchi A, Dean AF, Pilkington GJ. Extracellular matrix-modulated differential invasion of human meningioma cell lines in vitro. *Neurosci Lett*. 1999;263:214-216. doi:10.1016/S0304-3940(99)00125-1.
45. Ng HK, Wong AT. Expression of epithelial and extracellular matrix protein markers in meningiomas. *Histopathology*. 1993;22(2):113-125. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7681027.
46. Das A, Tan W-L, Smith DR. Expression of extracellular matrix markers in benign meningiomas. *Neuropathology*. 2003;23(4):275-281. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14719542>.
47. Al-Mefty O, Smith R. Tuberculum sellae meningiomas. In: *Al-Mefty O (ed) Meningiomas*. Ltd. New York, NY: Raven; 1991:395-411.
48. Bikmaz K, Mrak R, Al-Mefty O. Management of bone-invasive, hyperostotic sphenoid wing meningiomas. *J Neurosurg*. 2007;107:905-912. doi:10.3171/jns.2007.107.5.905.
49. Pieper DR, Al-Mefty O, Hanada Y, Buechner D. Hyperostosis associated with meningioma of the cranial base: secondary changes or tumor invasion. *Neurosurgery*. 1999;44(4):742-747.
50. Halaka AN, Bunning RA, Bird CC, Gibson M, Reynolds JJ. Production of collagenase and inhibitor (TIMP) by intracranial tumors and dura in vitro. *J Neurosurg*. 1983;59:461-466.
51. Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet*. 2012;205(12):613-621. doi:10.1016/j.cancergen.2012.10.009.
52. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4.
53. Bolteus AJ, Berens ME, Pilkington GJ. Migration and invasion in brain neoplasms. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2001;1(3):225-232. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11898522>.
54. Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(July):489-501. doi:10.1038/nrc1121.
55. Rojiani M V., Wiranowska M, Rojiani AM. Matrix metalloproteinases and their inhibitors – Friend or foe. In: Dietmar W. Siemann, ed. *Tumor Microenvironment*. John Wiley & Sons, Ltd; 2011.
56. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. *Neuroscience*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10799/>. Accessed February 8, 2016.

57. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4th ed. Lyon: IARC; 2007.
58. Brandes A, Franceschi E, Bertolini F, et al. Linee guida neoplasie cerebrali AIOM. 2015.
59. Domingo-Musibay E, Galanis E. What next for newly diagnosed glioblastoma? *Future Oncol*. 2015;11(24):3273-3283. doi:10.2217/fon.15.258.
60. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):296-307. doi:10.1038/nrc1319.
61. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330.
62. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000;343(19):1350-1354. doi:10.1056/NEJM200011093431901.
63. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997-1003. doi:10.1056/NEJMoa043331.
64. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):459-466. doi:10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
65. Stupp R, Hegi ME. Methylguanine methyltransferase testing in glioblastoma: when and how? *J Clin Oncol*. 2007;25(12):1459-1460. doi:10.1200/JCO.2006.09.7139.
66. Brada M, Stenning S, Gabe R, et al. Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma. *J Clin Oncol*. 2010;28(30):4601-4608. doi:10.1200/JCO.2009.27.1932.
67. Wick W, Hartmann C, Engel C, et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with Procarbazine, Lomustine, and Vincristine or Temozolomide. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5874-5880. doi:10.1200/JCO.2009.23.6497.
68. Van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer p. *J Clin Oncol*. 2006;24(18):2715-2722. doi:10.1200/JCO.2005.04.6078.
69. Wick W, Platten M, Meisner C, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: The NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(7):707-715. doi:10.1016/S1470-2045(12)70164-X.
70. Van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol*. 2013;31(3):344-350. doi:10.1200/JCO.2012.43.2229.
71. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-1812. doi:10.1126/science.1164382.
72. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765-773. doi:10.1056/NEJMoa0808710.
73. Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013;13(5):345. doi:10.1007/s11910-013-0345-4.
74. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science*. 2011;333(6041):425. doi:10.1126/science.1207313.

75. Bassett AR, Cooper SE, Ragab A, Travers AA. The chromatin remodelling factor dATRAX is involved in heterochromatin formation. *PLoS One*. 2008;3(5):e2099. doi:10.1371/journal.pone.0002099.
76. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*. 2012;3(7):709-722. doi:10.18632/oncotarget.588.
77. Wiestler B, Capper D, Holland-Letz T, et al. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol*. 2013;126(3):443-451. doi:10.1007/s00401-013-1156-z.
78. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061-1068. doi:10.1038/nature07385.
79. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020.
80. Sanai N, Berger MS. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery*. 2008;62(4):753-764. doi:10.1227/01.neu.0000318159.21731.cf.
81. Smith JS, Chang EF, Lamborn KR, et al. Role of extent of resection in the long-term outcome of low-grade hemispheric gliomas. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1338-1345. doi:10.1200/JCO.2007.13.9337.
82. Laws ER, Parney IF, Huang W, et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg*. 2003;99(3):467-473. doi:10.3171/jns.2003.99.3.0467.
83. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*. 2001;95(2):190-198. doi:10.3171/jns.2001.95.2.0190.
84. Crocetti E, Trama A, Stiller C, et al. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer*. 2012;48(10):1532-1542. doi:10.1016/j.ejca.2011.12.013.
85. Miller CR, Dunham CP, Scheithauer BW, Perry A. Significance of necrosis in grading of oligodendroglial neoplasms: a clinicopathologic and genetic study of newly diagnosed high-grade gliomas. *J Clin Oncol*. 2006;24(34):5419-5426. doi:10.1200/JCO.2006.08.1497.
86. Jordan JT, Gerstner ER, Batchelor TT, Cahill DP, Plotkin SR. Glioblastoma care in the elderly. *Cancer*. 2015:1-9.
87. Whittle IR, Denholm SW, Gregor A. Management of patients aged over 60 years with supratentorial glioma: lessons from an audit. *Surg Neurol*. 1991;36(2):106-111. doi:10.1016/0090-3019(91)90227-Z.
88. Ewelt C, Goepfert M, Rapp M, Steiger HJ, Stummer W, Sabel M. Glioblastoma multiforme of the elderly: the prognostic effect of resection on survival. *J Neurooncol*. 2011;103(3):611-618. doi:10.1007/s11060-010-0429-9.
89. Duffau H. The necessity of preserving brain functions in glioma surgery: the crucial role of intraoperative awake mapping. *World Neurosurg*. 2011;76(6):525-527. doi:10.1016/j.wneu.2011.07.040.
90. Skrap M, Marin D, Ius T, Fabbro F, Tomasino B. Brain mapping: a novel intraoperative neuropsychological approach. *J Neurosurg*. February 2016:1-11. doi:10.3171/2015.10.JNS15740.
91. Brandes A a, Monfardini S. The treatment of elderly patients with high-grade gliomas. *Semin Oncol*. 2003;30(6 Suppl 19):58-62. doi:10.1053/j.seminoncol.2003.11.025.
92. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, et al. Recurrence pattern after temozolomide concomitant with and adjuvant to radiotherapy in newly diagnosed patients with

- glioblastoma: Correlation with MGMT promoter methylation status. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1275-1279. doi:10.1200/JCO.2008.19.4969.
93. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21(21):2683-2710. doi:10.1101/gad.1596707.
94. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(1):46-54. doi:10.1038/35094059.
95. Paganetti PA, Caroni P, Schwab ME. Glioblastoma infiltration into central nervous system tissue in vitro: involvement of a metalloprotease. *J Cell Biol.* 1988;107(6 I):2281-2291.
96. Bernstein JJ, Woodard C a. Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. *Neurosurgery.* 1995;36(1):124-132; discussion 132.
97. Ruoslahti E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology.* 1996;6(5):489-492. doi:10.1093/glycob/6.5.489.
98. Gladson CL. The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58(10):1029-1040. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10515226.
99. Kumar S, Weaver VM. Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1-2):113-127. doi:10.1007/s10555-008-9173-4.
100. Sykova E. Plasticity of extracellular space. In: Walz Wolfgang, ed. *The Neuronal Environment - Brain Homeostasis in Health and Disease*. Humana Press; 2002:57-81.
101. Quirico-Santos T, Fonseca CO, Lagrota-Candido J. Brain sweet brain: importance of sugars for the cerebral microenvironment and tumor development. *Arq Neuropsiquiatr.* 2010;68(5):799-803. doi:10.1590/S0004-282X2010000500024.
102. Wiranowska M, Plaas A. Cytokines and extracellular matrix remodeling in the central nervous system. In: Berczi I. and Szentivanyi A., ed. *Neuroimmune Biology - Cytokines and the Brain*. Elsevier B.V. Science; 2008.
103. Levental I, Georges PC, Janmey PA. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter.* 2007;3(3):299-306. doi:10.1039/B610522J.
104. Mahesparan R, Read T-A, Lund-Johansen M, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, Engebraaten O. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol.* 2003;105(1):49-57. doi:10.1007/s00401-002-0610-0.
105. Sim H, Hu B, Viapiano MS. Reduced expression of the hyaluronan and proteoglycan link proteins in malignant gliomas. *J Biol Chem.* 2009;284(39):26547-26556. doi:10.1074/jbc.M109.013185.
106. Abaskharoun M, Bellemare M, Lau E, Margolis RU. Expression of hyaluronan and the hyaluronan-binding proteoglycans neurocan, aggrecan, and versican by neural stem cells and neural cells derived from embryonic stem cells. *Brain Res.* 2010;1327:6-15. doi:10.1016/j.brainres.2010.02.048.
107. Stallcup WB, Huang FJ. A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell Adh Migr.* 2008;2(3):192-201. doi:10.4161/cam.2.3.6279.
108. Brightman MW. The brain's interstitial clefts and their glial walls. *J Neurocytol.* 2002;31(8-9):595-603. doi:10.1023/A:1025783326667.
109. Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13(5):543-550. doi:10.1016/j.gde.2003.08.012.
110. Elkin BS, Azeloglu EU, Costa KD, Morrison B. Mechanical heterogeneity of the rat hippocampus measured by atomic force microscope indentation. *J Neurotrauma.* 2007;24(5):812-822. doi:10.1089/neu.2006.0169.
111. Kumar S. Cell-matrix mechanobiology: Applications to brain tumors and design of

- tissue engineering scaffolds. In: *Proceedings of the 31st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society: Engineering the Future of Biomedicine, EMBC 2009.* ; 2009:3350-3352. doi:10.1109/IEMBS.2009.5333188.
112. Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J.* 2000;79(1):144-152. doi:10.1016/S0006-3495(00)76279-5.
 113. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Beggs HE, Keely PJ. Mammary epithelial-specific disruption of focal adhesion kinase retards tumor formation and metastasis in a transgenic mouse model of human breast cancer. *Am J Pathol.* 2008;173(5):1551-1565. doi:10.2353/ajpath.2008.080308.
 114. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155(3):739-752. doi:10.1016/S0002-9440(10)65173-5.
 115. Yue W-Y, Chen Z-P. Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 2005;53(8):997-1002. doi:10.1369/jhc.4A6521.2005.
 116. Zhang S, Zhang D, Sun B. Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Lett.* 2007;254(2):157-164. doi:10.1016/j.canlet.2006.12.036.
 117. Inoue A, Takahashi H, Harada H, et al. Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity. *Int J Oncol.* 2010;37(5):1121-1131. doi:10.3892/ijo-00000764.
 118. Sanz L, Feijóo M, Blanco B, Serrano A, Álvarez-Vallina L. Generation of non-permissive basement membranes by anti-laminin antibody fragments produced by matrix-embedded gene-modified cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52(10):643-647. doi:10.1007/s00262-003-0400-0.
 119. Lakka SS, Rao JS. Antiangiogenic therapy in brain tumors. *Expert Rev Neurother.* 2008;8(10):1457-1473. doi:10.1586/14737175.8.10.1457.
 120. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 2007;11(1):69-82. doi:S1535-6108(06)00369-2 [pii]r10.1016/j.ccr.2006.11.020.
 121. Denysenko T, Gennero L, Roos MA, et al. Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. *Cell Biochem Funct.* 2010;28(5):343-351. doi:10.1002/cbf.1666.
 122. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2006;66(16):7843-7848. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1010.
 123. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science (80-).* 2009;324(5935):1670-1673. doi:10.1126/science.1171837.
 124. El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, et al. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain.* 2010;133(4):973-982. doi:10.1093/brain/awq044.
 125. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature.* 2010;468(7325):824-828. doi:10.1038/nature09557.
 126. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature.* 2010;468(7325):829-833. doi:10.1038/nature09624.
 127. Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV. Involvement of CD44, a Molecule with a Thousand Faces, in Cancer Dissemination. In: *Hyaluronan in Cancer Biology.* ; 2009:127-146. doi:10.1016/B978-012374178-3.10008-0.
 128. Veisheh M, Turley E a. Hyaluronan metabolism in remodeling extracellular matrix: probes for imaging and therapy of breast cancer. *Integr Biol (Camb).* 2011;3(4):304-315. doi:10.1039/c0ib00096e.
 129. Delpech B, Maingonnat C, Girard N, et al. Hyaluronan and hyaluronectin in the

- extracellular matrix of human brain tumour stroma. *Eur J Cancer*. 1993;29A(7):1012-1017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684596>. Accessed February 25, 2016.
130. Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J*. 1993;7:1233-1241.
131. Ranuncolo SM, Ladedá V, Specterman S, et al. CD44 expression in human gliomas. *J Surg Oncol*. 2002;79(1):30-35; discussion 35-36. doi:10.1002/jso.10045.
132. Wiranowska M, Rojiani AM, Gottschall PE, Moscinski LC, Johnson J, Saporta S. CD44 expression and MMP-2 secretion by mouse glioma cells: effect of interferon and anti-CD44 antibody. *Anticancer Res*. 2000;20(6 B):4301-4306.
133. Xu Y, Stamenkovic I, Yu Q. CD44 attenuates activation of the Hippo signaling pathway and is a prime therapeutic target for glioblastoma. *Cancer Res*. 2010;70(6):2455-2464. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2505.
134. Ariza A, López D, Mate JL, et al. Role of CD44 in the invasiveness of glioblastoma multiforme and the noninvasiveness of meningioma: an immunohistochemistry study. *Hum Pathol*. 1995;26(10):1144-1147. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7557949>. Accessed February 1, 2016.
135. Wiranowska M, Ladd S, Smith SR, Gottschall PE. CD44 adhesion molecule and neuro-glial proteoglycan NG2 as invasive markers of glioma. *Brain Cell Biol*. 2006;35(2-3):159-172. doi:10.1007/s11068-007-9009-0.
136. Annabi B, Bouzeghrane M, Moumdjian R, Moghrabi A, Béliveau R. Probing the infiltrating character of brain tumors: Inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCG. *J Neurochem*. 2005;94(4):906-916. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03256.x.
137. Novak U, Stylli SS, Kaye AH, Lepperdinger G. Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res*. 1999;59(24):6246-6250.
138. Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M. The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review). *Int J Cancer*. 1995;60(5):632-636. doi:10.1002/ijc.2910600511.
139. Deed R, Rooney P, Kumar P, et al. Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high- molecular-weight hyaluronan. *Int J Cancer*. 1997;71(2):251-256. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970410)71:2<251::AID-IJC21>3.0.CO;2-J.
140. Lüke HJ, Prehm P. Synthesis and shedding of hyaluronan from plasma membranes of human fibroblasts and metastatic and non-metastatic melanoma cells. *Biochem J*. 1999;343 Pt 1:71-75. doi:10.1042/0264-6021:3430071.
141. Kearns SM, Laywell ED, Kukekov VK, Steindler DA. Extracellular matrix effects on neurosphere cell motility. *Exp Neurol*. 2003;182(1):240-244. doi:10.1016/S0014-4886(03)00124-9.
142. Viapiano MS, Matthews RT. From barriers to bridges: chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology. *Trends Mol Med*. 2006;12(10):488-496. doi:10.1016/j.molmed.2006.08.007.
143. Schrappe M, Klier FG, Spiro RC, Waltz TA, Reisfeld RA, Gladson CL. Correlation of chondroitin sulfate proteoglycan expression on proliferating brain capillary endothelial cells with the malignant phenotype of astroglial cells. *Cancer Res*. 1991;51(18):4986-4993.
144. Lin XH, Dahlin-Huppe K, Stallcup WB. Interaction of the NG2 proteoglycan with the actin cytoskeleton. *J Cell Biochem*. 1996;63(4):463-477. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19961215)63:4<463::AID-JCB8>3.0.CO;2-R.
145. Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004;64(19):7011-7021. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1364.

146. Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2010;277(19):3904-3923. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07800.x.
147. Knott JCA, Mahesparan R, Garcia-Cabrera I, et al. Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *Int J Cancer.* 1998;75(6):864-872. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19980316)75:6<864::AID-IJC8>3.0.CO;2-T.
148. Yamamoto M, Sawaya R, Mohanam S, et al. Expression and localization of urokinase-type plasminogen activator in human astrocytomas in vivo. *Cancer Res.* 1994;54(14):3656-3661.
149. Tysnes BB, Mahesparan R, Thorsen F, et al. Laminin expression by glial fibrillary acidic protein positive cells in human gliomas. *Int J Dev Neurosci.* 1999;17(531):531-539. doi:10.1016/S0736-5748(99)00055-6.
150. Hibino S, Shibuya M, Engbring JA, Mochizuki M, Nomizu M, Kleinman HK. Identification of an active site on the laminin alpha5 chain globular domain that binds to CD44 and inhibits malignancy. *Cancer Res.* 2004;64(14):4810-4816. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0129.
151. Ljubimova JY, Fugita M, Khazenzon NM, et al. Association between laminin-8 and glial tumor grade, recurrence, and patient survival. *Cancer.* 2004;101(3):604-612. doi:10.1002/cncr.20397.
152. Zagzag D, Friedlander DR, Miller DC, et al. Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis. *Cancer Res.* 1995;55(4):907-914.
153. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010;141(1):52-67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015.
154. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161-174. doi:10.1038/nrc745.
155. Jodele S, Blavier L, Yoon JM, DeClerck YA. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(1):35-43. doi:10.1007/s10555-006-7887-8.
156. VanMeter TE, Rooprai HK, Kibble MM, Fillmore HL, Broaddus WC, Pilkington GJ. The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: co-dependent and interactive proteolysis. *J Neurooncol.* 2001;53(2):213-235. doi:10.1023/A:1012280925031.
157. Forsyth P a, Wong H, Laing TD, et al. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer.* 1999;79:1828-1835. doi:10.1038/sj.bjc.6990291.
158. Wang M, Wang T, Liu S, Yoshida D, Teramoto A. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol.* 2003;20(2):65-72. <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02483449>. Accessed March 12, 2016.
159. Abe T, Mori T, Kohno K, et al. Expression of 72 kDa type IV collagenase and invasion activity of human glioma cells. *Clin Exp Metastasis.* 1994;12(4):296-304. doi:10.1007/BF01753836.
160. Uhm JH, Dooley NP, Villemure JG, Yong VW. Glioma invasion in vitro: regulation by matrix metalloprotease-2 and protein kinase C. *Clin Exp Metastasis.* 1996;14(5):421-433. doi:10.1007/BF00128958.
161. Raithatha SA, Muzik H, Rewcastle NB, Johnston RN, Edwards DR, Forsyth PA. Localization of gelatinase-A and gelatinase-B mRNA and protein in human gliomas. *Neuro Oncol.* 2000;2(3):145-150. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1920497&tool=pmcentrez>

- &rendertype=abstract.
162. Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, et al. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. *J Neurosurg.* 1994;81(1):69-77.
163. Zhang B, Gu F, She C, et al. Reduction of Akt2 inhibits migration and invasion of glioma cells. *Int J Cancer.* 2009;125(3):585-595. doi:10.1002/ijc.24314.
164. Sameshima T, Nabeshima K, Toole BP, et al. Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas. *Int J cancer.* 2000;88(1):21-27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962435>. Accessed March 12, 2016.
165. Toole BP, Slomiany MG. Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance. *Drug Resist Updat.* 2008;11(3):110-121. doi:10.1016/j.drug.2008.04.002.
166. Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, et al. Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and Its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 1996;56(2):384-392.
167. Deryugina EI, Bourdon MA, Luo GX, Reisfeld RA, Strongin A. Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. *J Cell Sci.* 1997;110(Pt 19):2473-2482. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9410885>. Accessed March 12, 2016.
168. Lampert K, Machein U, Machein MR, Conca W, Peter HH, Volk B. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. *Am J Pathol.* 1998;153(2):429-437. doi:10.1016/S0002-9440(10)65586-1.
169. Nakada M, Kita D, Futami K, et al. Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. *J Neurosurg.* 2001;94(3):464-473. doi:10.3171/jns.2001.94.3.0464.
170. Murphy G, Stanton H, Cowell S, et al. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS.* 1999;107(1):38-44. doi:10.1111/j.1699-0463.1999.tb01524.x.
171. Markovic DS, Vinnakota K, Chirasani S, et al. Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(30):12530-12535. doi:10.1073/pnas.0804273106.
172. Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 2005;115(6):849-860. doi:10.1002/ijc.20945.
173. Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000;2(10):737-744. doi:10.1038/35036374.
174. Fang J, Shing Y, Wiederschain D, et al. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(8):3884-3889. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18111&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed March 12, 2016.
175. Stylli SS, Kaye AH, Lock P. Invadopodia: At the cutting edge of tumour invasion. *J Clin Neurosci.* 2008;15(7):725-737. doi:10.1016/j.jocn.2008.03.003.
176. Lettau I, Hattermann K, Held-Feindt J, Brauer R, Sedlacek R, Mentlein R. Matrix metalloproteinase-19 is highly expressed in astroglial tumors and promotes invasion of glioma cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69(3):215-223. doi:10.1097/NEN.0b013e3181ce9f67.
177. Stojic J, Hagemann C, Haas S, et al. Expression of matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-11 and MMP-19 is correlated with the WHO-grading of human malignant gliomas. *Neurosci Res.* 2008;60(1):40-49. doi:10.1016/j.neures.2007.09.009.
178. Sarkar S, Nuttall RK, Liu S, Edwards DR, Yong VW. Tenascin-C stimulates glioma

- cell invasion through matrix metalloproteinase-12. *Cancer Res.* 2006;66(24):11771-11780. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0470.
179. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477(1-2):267-283. doi:10.1016/S0167-4838(99)00279-4.
180. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997;74(2):111-122.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9352216.
181. Nagase H, Meng Q, Malinovsky V, et al. Engineering of selective TIMPs. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol 878. ; 1999:1-11. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07670.x.
182. Baker a H, George SJ, Zaltsman a B, Murphy G, Newby a C. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer.* 1999;79(9-10):1347-1355. doi:10.1038/sj.bjc.6690217.
183. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001;61(8):3225-3229.
184. Pagenstecher A, Wussler EM, Opdenakker G, Volk B, Campbell IL. Distinct expression patterns and levels of enzymatic activity of matrix metalloproteinases and their inhibitors in primary brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(6):598-612. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11398836>.
185. Groft LL, Muzik H, Rewcastle NB, et al. Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas. *Br J Cancer.* 2001;85(1):55-63. doi:10.1054/bjoc.2001.1854.
186. Kjaerboe L, Lonn S, Scheie D, et al. Incidence of intracranial meningiomas in Denmark, Finland, Norway and Sweden, 1968–1997. *Int J Cancer.* 2005;117(6):996-1001.
187. Sadetzki S, Flint-Richter P, Ben-Tal T, Nass D. Radiation-induced meningioma: a descriptive study of 253 cases. *J Neurosurg.* 2002;97(5):1078-1082. doi:10.3171/jns.2002.97.5.1078.
188. Schneider B, Pülhorn H, Röhrig B, Rainov NG. Predisposing conditions and risk factors for development of symptomatic meningioma in adults. *Cancer Detect Prev.* 2005;29(5):440-447. doi:10.1016/j.cdp.2005.07.002.
189. Flint-Richter P, Mandelzweig L, Oberman B, Sadetzki S. Possible interaction between ionizing radiation, smoking, and gender in the causation of meningioma. *Neuro Oncol.* 2011;13(3):345-352. doi:10.1093/neuonc/noq201.
190. Benson VS, Pirie K, Reeves Gillian K. GK, Beral V, Green J, Schuz J. Mobile phone use and risk of brain neoplasms and other cancers: prospective study. *Int J Epidemiol.* 2013;42(3):792-802. doi:10.1093/ije/dyt072.
191. Mawrin C, Chung C, Preusser M. Biology and clinical management challenges in meningioma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2015;35:e106-e115. doi:10.14694/EdBook_AM.2015.35.e106.
192. Antinheimo J, Sankila R, Carpén O, Pukkala E, Sainio M, Jääskeläinen J. Population-based analysis of sporadic and type 2 neurofibromatosis-associated meningiomas and schwannomas. *Neurology.* 2000;54(1):71-76. doi:10.1212/WNL.54.1.71.
193. Smith MJ, Higgs JE, Bowers NL, et al. Cranial meningiomas in 411 neurofibromatosis type 2 (NF2) patients with proven gene mutations: clear positional effect of mutations, but absence of female severity effect on age at onset. *J Med Genet.* 2011;48(4):261-265. doi:10.1136/Jmg.2010.085241.
194. State of the Art Oncology in Europe - Meningioma. <http://www.startoncology.net/area-professionale/meningioma/>. Accessed January 12, 2016.
195. Catala M. Embryonic and fetal development of structures associated with the cerebro-

- spinal fluid in man and other species. Part I: The ventricular system, meninges and choroid plexuses. *Arch Anat Cytol Pathol*. 1998;46(3):153-169.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9754371>.
196. Mawrin C, Perry A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol*. 2010;99:379-391. doi:10.1007/s11060-010-0342-2.
197. Kros J, De Greve K, Van Tilborg A, et al. NF2 status of meningiomas is associated with tumour localization and histology. *J Pathol*. 2001;194(3):367-372. doi:10.1002/path.909.
198. Lee JH, Sade B, Choi E, Golubic M, Prayson R. Meningothelioma as the predominant histological subtype of midline skull base and spinal meningioma. *J Neurosurg*. 2006;105(1):60-64. doi:10.3171/jns.2006.105.1.60.
199. Durand A, Labrousse F, Jouvet A, et al. WHO grade II and III meningiomas: a study of prognostic factors. *J Neurooncol*. 2009;95(3):367-375. doi:10.1007/s11060-009-9934-0.
200. Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC. "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer*. 1999;85(9):2046-2056. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19990501)85:9<2046::AID-CNCR23>3.0.CO;2-M.
201. Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol*. 1997;21(12):1455-1465.
202. Rouleau G a, Merel P, Lutchman M, et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature*. 1993;363(6429):515-521. doi:10.1038/363515a0.
203. Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, et al. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell*. 1993;72(5):791-800. doi:10.1016/0092-8674(93)90406-G.
204. Evans DG, Huson SM, Donnai D, et al. A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness, and confirmation of maternal transmission effect on severity. *J Med Genet*. 1992;29(12):841-846. doi:10.1136/jmg.29.12.841.
205. Seizinger BR, de la Monte S, Atkins L, Gusella JF, Martuza RL. Molecular genetic approach to human meningioma: loss of genes on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(15):5419-5423. doi:10.1073/pnas.84.15.5419.
206. Dumanski JP, Carlsson E, Collins VP, Nordenskjöld M. Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(24):9275-9279.
207. Rutledge MH, Xie YG, Han FY, et al. Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosom Cancer*. 1994;10(2):122-130.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7520265.
208. Dumanski JP, Rouleau G a, Nordenskjöld M, Collins VP. Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res*. 1990;50:5863-5867.
209. Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, et al. Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet*. 1994;6(2):180-184. doi:10.1038/ng0294-180.
210. Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A. Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology*. 1997;49(1):267-270.
211. Curto M, McClatchey AI. Nf2/Merlin: a coordinator of receptor signalling and intercellular contact. *Br J Cancer*. 2008;98(2):256-262. doi:10.1038/sj.bjc.6604002.
212. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, et al. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol*. 1995;146(4):827-832.

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1869258&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
213. Brastianos PK, Horowitz PM, Santagata S, et al. Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nat Genet.* 2013;45(3):285-289. doi:10.1038/ng.2526.
214. Goutagny S, Yang HW, Zucman-Rossi J, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of meningioma malignant progression dependent on the underlying NF2 status. *Clin Cancer Res.* 2010;16(16):4155-4164. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0891.
215. Hartmann C, Sieberns J, Gehlhaar C, Simon M, Paulus W, von Deimling A. NF2 mutations in secretory and other rare variants of meningiomas. *Brain Pathol.* 2006;16(1):15-19. doi:10.1111/j.1750-3639.2006.tb00557.x.
216. Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G, et al. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics.* 2007;8:16. doi:10.1186/1471-2164-8-16.
217. Wada K, Maruno M, Suzuki T, et al. Chromosomal and genetic aberrations differ with meningioma subtype. *Brain Tumor Pathol.* 2004;21(3):127-133. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15696974.
218. Heinrich B, Hartmann C, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, MacCollin M. Multiple meningiomas: Investigating the molecular basis of sporadic and familial forms. *Int J Cancer.* 2003;103(4):483-488. doi:10.1002/ijc.10840.
219. Hsieh H-Y, Wu T, Wang C-J, Chin S-C, Chen Y-R. Neurological complications involving the central nervous system in neurofibromatosis type 1. *Acta Neurol Taiwan.* 2007;16(2):68-73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17685129>.
220. Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, et al. Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science.* 2013;339(6123):1077-1080. doi:10.1126/science.1233009.
221. Sahm F, Bissel J, Koelsche C, et al. AKT1E17K mutations cluster with meningothelial and transitional meningiomas and can be detected by SFRP1 immunohistochemistry. *Acta Neuropathol.* 2013;126(5):757-762. doi:10.1007/s00401-013-1187-5.
222. Gutmann DH, Donahoe J, Perry A, et al. Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Mol Genet.* 2000;9(10):1495-1500.
223. Perry A, Cai DX, Scheithauer BW, et al. Merlin, DAL-1, and progesterone receptor expression in clinicopathologic subsets of meningioma: a correlative immunohistochemical study of 175 cases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000;59(10):872-879.
224. Nunes F, Shen Y, Niida Y, et al. Inactivation patterns of NF2 and DAL-1/4.1B (EPB41L3) in sporadic meningioma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;162(2):135-139. doi:10.1016/j.cancergencyto.2005.04.003.
225. Weisman AS, Raguet SS, Kelly PA. Characterization of the epidermal growth factor receptor in human meningioma. *Cancer Res.* 1987;47(8):2172-2176. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/47/8/2172.abstract>. Accessed February 10, 2016.
226. Maxwell M, Galanopoulos T, Tessa Hedley-Whyte E, McL. Black P, Antoniades HN. Human meningiomas co-express platelet-derived growth factor (pdgf) and pdgf-receptor genes and their protein products. *Int J Cancer.* 1990;46(1):16-21. doi:10.1002/ijc.2910460106.
227. Baumgarten P, Brokinkel B, Zinke J, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR1 and VEGFR2 in primary and recurrent WHO

- grade III meningiomas. *Histol Histopathol*. 2013;28(9):1157-1166.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23475388>. Accessed January 28, 2016.
228. Lichtor T, Kurpakus MA, Gurney ME. Expression of insulin-like growth factors and their receptors in human meningiomas. *J Neurooncol*. 1993;17(3):183-190.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8164055>. Accessed February 10, 2016.
229. Krayenbühl N, Pravdenkova S, Al-Mefty O. De novo versus transformed atypical and anaplastic meningiomas: comparisons of clinical course, cytogenetics, cytokinetics, and outcome. *Neurosurgery*. 2007;61:495-503.
doi:10.1227/01.NEU.0000290895.92695.22.
230. Yang S-Y, Park C-K, Park S-H, Kim DG, Chung YS, Jung H-W. Atypical and anaplastic meningiomas: prognostic implications of clinicopathological features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(5):574-580. doi:10.1136/jnnp.2007.121582.
231. Simon M, Von Deimling a., Larson JJ, et al. Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: A genetic model of meningioma progression. *Cancer Res*. 1995;55(20):4696-4701.
232. Weber RG, Boström J, Wolter M, et al. Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14719-14724.
doi:10.1073/pnas.94.26.14719.
233. Gabeau-Lacet D, Engler D, Gupta S, et al. Genomic profiling of atypical meningiomas associates gain of 1q with poor clinical outcome. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009;68(10):1155-1165. doi:10.1097/NEN.0b013e3181ba3952.
234. Krupp W, Holland H, Koschny R, et al. Genome-wide genetic characterization of an atypical meningioma by single-nucleotide polymorphism array-based mapping and classical cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;184(2):87-93.
doi:10.1016/j.cancergencyto.2008.03.015.
235. Lee JYK, Finkelstein S, Hamilton RL, Rekha R, King JT, Omalu B. Loss of heterozygosity analysis of benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Neurosurgery*. 2004;55(5):1163-1173.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509323>. Accessed January 13, 2016.
236. Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S, et al. Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent in situ hybridization. *Cancer*. 1998;83(Grade 1):360-366. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19980715)83:2<360::AID-CNCR21>3.0.CO;2-Q.
237. Sulman EP, White PS, Brodeur GM. Genomic annotation of the meningioma tumor suppressor locus on chromosome 1p34. *Oncogene*. 2004;23(4):1014-1020.
doi:10.1038/sj.onc.1206623.
238. Lee Y, Liu J, Patel S, et al. Genomic landscape of meningiomas. *Brain Pathol*. 2010;20:751-762. doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00356.x.
239. Carvalho LH, Smirnov I, Baia GS, et al. Molecular signatures define two main classes of meningiomas. *Mol Cancer*. 2007;6(64):1-10. doi:10.1186/1476-4598-6-64.
240. Al-Mefty O, Topsakal C, Pravdenkova S, Sawyer JR, Harrison MJ. Radiation-induced meningiomas: clinical, pathological, cytokinetic, and cytogenetic characteristics. *J Neurosurg*. 2004;100(6):1002-1013. doi:10.3171/jns.2004.100.6.1002.
241. Barski D, Wolter M, Reifenberger G, Riemenschneider MJ. Hypermethylation and transcriptional downregulation of the TIMP3 gene is associated with allelic loss on 22q12.3 and malignancy in meningiomas. *Brain Pathol*. 2010;20:623-631.
doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00340.x.
242. Bian J, Wang Y, Smith MR, et al. Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3. *Carcinogenesis*. 1996;17:1805-1811.
243. Linsler S, Kraemer D, Driess C, et al. Molecular biological determinations of

- meningioma progression and recurrence. *PLoS One*. 2014;9(4):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0094987.
244. Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, et al. Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol*. 2001;159(2):661-669. doi:10.1016/S0002-9440(10)61737-3.
 245. Perry A, Banerjee R, Lohse CM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Scheithauer BW. A role for chromosome 9p21 deletions in the malignant progression of meningiomas and the prognosis of anaplastic meningiomas. *Brain Pathol*. 2002;12:183-190.
 246. Zhang X, Gejman R, Mahta A, et al. Maternally expressed gene 3, an imprinted noncoding RNA gene, is associated with meningioma pathogenesis and progression. *Cancer Res*. 2010;70(6):2350-2358. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3885.
 247. Balik V, Srovnal J, Sulla I, et al. MEG3: A novel long noncoding potentially tumour-suppressing RNA in meningiomas. *J Neurooncol*. 2013;112:1-8. doi:10.1007/s11060-012-1038-6.
 248. Lusis E a., Watson M a., Chicoine MR, et al. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res*. 2005;65(16):7121-7126. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0043.
 249. Skiriute D, Tamasauskas S, Asmoniene V, et al. Tumor grade-related NDRG2 gene expression in primary and recurrent intracranial meningiomas. *J Neurooncol*. 2011;102(1):89-94. doi:10.1007/s11060-010-0291-9.
 250. Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(1):22-39. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=497230&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed October 17, 2015.
 251. Sughrue ME, Kane AJ, Shangari G, et al. The relevance of Simpson Grade I and II resection in modern neurosurgical treatment of World Health Organization Grade I meningiomas. *J Neurosurg*. 2010;113(5):1029-1035. doi:10.3171/2010.3.JNS091971.
 252. Larson JJ, van Loveren HR, Balko MG, Tew JM. Evidence of meningioma infiltration into cranial nerves: clinical implications for cavernous sinus meningiomas. *J Neurosurg*. 1995;83(4):596-599. doi:10.3171/jns.1995.83.4.0596.
 253. O'Sullivan MG, van Loveren HR, Tew JM. The surgical resectability of meningiomas of the cavernous sinus. *Neurosurgery*. 1997;40(2):238-244; discussion 245-247. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007855>. Accessed February 10, 2016.
 254. Bruner JM, Tien RD, Enterline DS. Tumors of the meninges and related tissues. In: Bigner DD, McLendon RE, Bruner JM, eds. *Russell and Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System*. 6th ed. London: Edward Arnold; 1998:67-140.
 255. Rutka JT, Giblin J, Dougherty D V, McCulloch JR, DeArmond SJ, Rosenblum ML. An ultrastructural and immunocytochemical analysis of leptomeningeal and meningioma cultures. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1986;45(3):285-303. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3083053.
 256. Hitchcock E, Morris CS. Immunocytochemistry of intracranial meningiomas. *J Neurooncol*. 1987;5(0167-594X (Print)):357-368.
 257. Kochi N, Tani E, Morimura T, Itagaki T. Immunohistochemical study of fibronectin in human glioma and meningioma. *Acta Neuropathol*. 1983;59(2):119-126. doi:10.1007/BF00691597.
 258. Bellon G, Caulet T, Cam Y, et al. Immunohistochemical localisation of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol*. 1985;66(3):245-252. doi:10.1007/BF00688590.
 259. Aldape K, Chen P, Dougherty D, DeArmond S, Israel M. Establishment of a

- meningioma cell line and characterization of its vitronectin and vitronectin receptor expression. *Brain Pathol.* 1994;4:439.
260. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991;5(8):2145-2154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1850705>.
261. Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen R a, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol.* 1996;149(1):273-282.
262. Nielsen BS, Sehested M, Kjeldsen L, Borregaard N, Rygaard J, Dano K. Expression of matrix metalloprotease-9 in vascular pericytes in human breast cancer. *Lab Investig.* 1997;77(4):345-355.
263. Zedenius J, Ståhle-Bäckdahl M, Enberg U, et al. Stromal fibroblasts adjacent to invasive thyroid tumors: expression of gelatinase A but not stromelysin 3 mRNA. *World J Surg.* 1996;20(1):101-106. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8588399>. Accessed January 28, 2016.
264. Rao JS, Steck PA, Mohanam S, Stetler-stevenson WG, Liotta LA. Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res.* 1993;53:2208-2211.
265. Kieseier BC, Kiefer R, Clements JM, et al. Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 1998;121 (Pt 1):159-166. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9549496>. Accessed January 28, 2016.
266. Probstmeier R, Montag D, Schachner M. Galectin-3, a beta-galactoside-binding animal lectin, binds to neural recognition molecules. *J Neurochem.* 1995;64(6):2465-2472. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7539053>.
267. Bresalier RS, Yan PS, Byrd JC, Lotan R, Raz A. Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system. *Cancer.* 1997;80(4):776-787. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9264362>.
268. Radotra B, McCormick D, Crockard A. CD44 plays a role in adhesive interactions between glioma cells and extracellular matrix components. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994;20(4):399-405. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528901>.
269. Figarella-Branger D, Roche PH, Daniel L, Dufour H, Bianco N, Pellissier JF. Cell-adhesion molecules in human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1997;23(2):113-122. doi:10.1111/j.1365-2990.1997.tb01193.x.
270. Rooprai HK, Liyanage K, King A, Davies D, Martin K, Pilkington GJ. CD44 expression in human meningiomas: an immunocytochemical, immunohistochemical and flow cytometric analysis. *Int J Oncol.* 1999;14(5):855-860. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10200334>.
271. Kuppner MC, Van Meir E, Gauthier T, Hamou MF, de Tribolet N. Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours. *Int J Cancer.* 1992;50(4):572-577. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1537623>.
272. Dahl KN, Engler AJ, Pajerowski JD, Discher DE. Power-law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures. *Biophys J.* 2005;89(4):2855-2864. doi:10.1529/biophysj.105.062554.
273. Janmey P a, McCulloch C a. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007;9:1-34. doi:10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151927.
274. Ellis RJ. Macromolecular crowding: Obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(10):597-604. doi:10.1016/S0968-0004(01)01938-7.
275. Charras GT, Yarrow JC, Horton M a, Mahadevan L, Mitchison TJ. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature.* 2005;435(7040):365-369.

- doi:10.1038/nature03550.
276. Ingber DE, Madri J a, Jamieson JD. Role of basal lamina in neoplastic disorganization of tissue architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(6):3901-3905. doi:10.1073/pnas.78.6.3901.
277. Ingber DE. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 7):1157-1173. doi:10.1242/jcs.00359.
278. Ingber DE. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:575-599. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.575.
279. Kitterman J a. The effects of mechanical forces on fetal lung growth. *Clin Perinatol*. 1996;23:727-740.
280. Farge E. Mechanical induction of Twist in the Drosophila foregut/stomodaeal primordium. *Curr Biol*. 2003;13(16):1365-1377. doi:10.1016/S.
281. Dzamba BJ, Jakab KR, Marsden M, Schwartz M a, DeSimone DW. Cadherin adhesion, tissue tension, and noncanonical Wnt signaling regulate fibronectin matrix organization. *Dev Cell*. 2009;16(3):421-432. doi:10.1016/j.devcel.2009.01.008.
282. Forgacs G. Surface tension and viscoelastic properties of embryonic tissues depend on the cytoskeleton. *Biol Bull*. 1998;194(3):328-329; discussion 329-330. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11536875>. Accessed January 24, 2016.
283. Samani A, Bishop J, Luginbuhl C, Plewes DB. Measuring the elastic modulus of ex vivo small tissue samples. *Phys Med Biol*. 2003;48(14):2183-2198. doi:10.1088/0031-9155/48/14/310.
284. Huang S, Ingber DE. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell*. 2005;8(3):175-176. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.009.
285. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From Cell-ECM Interactions to Tissue Engineering. *J Cell Physiol*. 2004;199(2):174-180. doi:10.1002/jcp.10471.
286. KIANI C, CHEN L, WU YJ, YEE AJ, YANG BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Res*. 2002;12(1):19-32. doi:10.1038/sj.cr.7290106.
287. Sund M, Xie L, Kalluri R. The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumor angiogenesis. *APMIS*. 2004;112(7-8):450-462. doi:10.1111/j.1600-0463.2004.t01-1-apm11207-0806.x.
288. Welling L, Zupka M, Welling D. Mechanical Properties of Basement Membrane. *News Physiol Sci*. 1995;10(1):30-35. <http://physiologyonline.physiology.org/content/10/1/30>. Accessed January 24, 2016.
289. Chen CS, Tan J, Tien J. Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:275-302. doi:10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140040.
290. Lecuit T, Lenne P-F. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(8):633-644. doi:10.1038/nrm2222.
291. Fenteany G, Janmey PA, Stossel TP. Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets. *Curr Biol*. 2000;10(14):831-838. doi:10.1016/S0960-9822(00)00579-0.
292. Dudek SM, Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*. 2001;91(4):1487-1500.
293. Qin J, Vinogradova O, Plow EF. Integrin bidirectional signaling: A molecular view. *PLoS Biol*. 2004;2(6):726-729. doi:10.1371/journal.pbio.0020169.
294. Schwartz M a, Assoian RK. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 14):2553-2560. doi:10.1007/s10555-005-5130-7.
295. Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: A five-step process. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1-2):129-135. doi:10.1007/s10555-008-9174-3.
296. Engler AJ, Humbert PO, Wehrle-Haller B, Weaver VM. Multiscale modeling of form

- and function. *Science*. 2009;324(5924):208-212. doi:10.1126/science.1170107.
297. Jaalouk DE, Lammerding J. Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(1):63-73. doi:10.1038/nrm2597.
298. Shao ZM, Nguyen M, Barsky SH. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene*. 2000;19(38):4337-4345. doi:10.1038/sj.onc.1203785.
299. Boucher Y, Jain RK. Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: Implications for vascular collapse. *Cancer Res*. 1992;52(18):5110-5114.
300. Less JR, Posner MC, Boucher Y, Borochoy D, Wolmark N, Jain RK. Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors. *Cancer Res*. 1992;52(22):6371-6374.
301. Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS One*. 2009;4(2):e4632. doi:10.1371/journal.pone.0004632.
302. Kasas S, Thomson NH, Smith BL, Hansma PK, Miklossy J, Hansma HG. Biological applications of the AFM: From single molecules to organs. *Int J Imaging Syst Technol*. 1997;8(2):151-161. doi:10.1002/(SICI)1098-1098(1997)8:2<151::AID-IMA2>3.0.CO;2-9.
303. Kasas S, Longo G, Dietler G. Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy. *J Phys D Appl Phys*. 2013;46:133001. doi:10.1088/0022-3727/46/13/133001.
304. Cheng S, Clarke EC, Bilston LE. Rheological properties of the tissues of the central nervous system: a review. *Med Eng Phys*. 2008;30(10):1318-1337. doi:10.1016/j.medengphy.2008.06.003.
305. Ananthanarayanan B, Kim Y, Kumar S. Elucidating the mechanobiology of malignant brain tumors using a brain matrix-mimetic hyaluronic acid hydrogel platform. *Biomaterials*. 2011;32(31):7913-7923. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.005.
306. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res*. 2004;64(3):920-927. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2073.
307. Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest*. 2004;84(4):397-405. doi:10.1038/labinvest.3700070.
308. Pettikiriachchi JTS, Parish CL, Shoichet MS, Forsythe JS, Nisbet DR. Biomaterials for brain tissue engineering. *Aust J Chem*. 2010;63(8):1143. doi:10.1071/CH10159.
309. van Dommelen JAW, van der Sande TPJ, Hrapko M, Peters GWM. Mechanical properties of brain tissue by indentation: interregional variation. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2010;3(2):158-166. doi:10.1016/j.jmbbm.2009.09.001.
310. Budday S, Nay R, de Rooij R, et al. Mechanical properties of gray and white matter brain tissue by indentation. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;46:318-330. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.02.024.
311. Luciano Vella, ed. Meningiomi. In: *Enciclopedia Medica Italiana*. Firenze: USES edizioni scientifiche; 1992:4996-4999.
312. Campi G, Fratini M, Bukreeva I, et al. Imaging collagen packing dynamics during mineralization of engineered bone tissue. *Acta Biomater*. 2015;23:309-316. doi:10.1016/j.actbio.2015.05.033.
313. Florczyk SJ, Wang K, Jana S, et al. Porous chitosan-hyaluronic acid scaffolds as a mimic of glioblastoma microenvironment ECM. *Biomaterials*. 2013;34(38):10143-10150. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.034.
314. Nimsky C, Ganslandt O, Cerny S, Hastreiter P, Greiner G, Fahlbusch R. Quantification

- of, visualization of, and compensation for brain shift using intraoperative magnetic resonance imaging. *Neurosurgery*. 2000;47(5):1070-1080.
315. Nabavi A, McL. Black P, Gering DT, et al. Serial intraoperative magnetic resonance imaging of brain shift. *Neurosurgery*. 2001;48(4):787-798. doi:10.1227/00006123-200104000-00019.
316. Trantakis C, Tittgemeyer M, Schneider J-P, et al. Investigation of time-dependency of intracranial brain shift and its relation to the extent of tumor removal using intraoperative MRI. *Neurol Res*. 2003;25(1):9-12. doi:10.1179/016164103101200923.
317. Reinges MHT, Nguyen HH, Krings T, et al. Course of brain shift during microsurgical resection of supratentorial cerebral lesions: limits of conventional neuronavigation. *Acta Neurochir (Wien)*. 2004;146(4):369-377. doi:10.1007/s00701-003-0204-1.
318. Letteboer MMJ, Willems PWA, Viergever MA, Niessen WJ. Brain shift estimation in image-guided neurosurgery using 3-D ultrasound. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2005;52(2):268-276. doi:10.1109/TBME.2004.840186.
319. Nimsky C, Ganslandt O, Hastreiter P, et al. Intraoperative diffusion-tensor MR imaging: shifting of white matter tracts during neurosurgical procedures - initial experience. *Radiology*. 2005;234(1):218-225. doi:10.1148/radiol.2341031984.
320. Unsgaard G, Rygh OM, Selbekk T, et al. Intra-operative 3D ultrasound in neurosurgery. *Acta Neurochir*. 2006;148(3):235-253. doi:10.1007/s00701-005-0688-y.